



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA**

**Erika Tiemi Nakandakare Maia**

**Efeito terapêutico do extrato da folha de  
Bergamota (*Citrus bergamia*) sobre a resistência à  
leptina em modelo experimental de obesidade  
induzida por dieta rica em açúcar e gordura**

Dissertação apresentada à  
Faculdade de Medicina,  
Universidade Estadual Paulista “Júlio  
de Mesquita Filho”, Câmpus de  
Botucatu, para obtenção do título de  
Mestre(a) em Patologia.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Camila Renata Corrêa  
Coorientador(a): Prof(a). Dr(a). Fabiane Valentini Francisqueti-Ferron

**Botucatu  
2022**

Erika Tiemi Nakandakare Maia

Efeito terapêutico do extrato das folhas de Bergamota (*Citrus bergamia*) sobre a resistência à leptina em modelo experimental de obesidade induzida por dieta rica em açúcar e gordura

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre(a) em Patologia.

Orientador (a): Prof(a).Dr(a). Camila Renata Corrêa  
Coorientador(a):Prof(a).Dr(a). Fabiane Valentini Francisqueti-Ferron

Botucatu  
2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Maia, Erika Tiemi Nakandakare.

Efeito terapêutico do extrato da folha de Bergamota (Citrus bergamia) sobre a resistência à leptina em modelo experimental de obesidade induzida por dieta rica em açúcar e gordura / Erika Tiemi Nakandakare Maia. - Botucatu, 2022

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu  
Orientador: Camila Renata Corrêa  
Coorientador: Fabiane Valentini Francisqueti-Ferron  
Capes: 20803001

1. Obesidade. 2. Citrus. 3. Usos Terapêuticos. 4. Extratos vegetais. 5. Leptina. 6. Dietas.

Palavras-chave: Bergamota; Obesidade; Resistência leptina.

## **Dedicatória**

---

*Dedico este trabalho aos meus pais, que são meus maiores e melhores exemplos na vida, e nunca mediram esforços para garantir o meu crescimento pessoal e profissional.*

*Ao meu marido, meu grande companheiro que, a cada nova jornada, sempre me concede o apoio e o suporte necessário para que eu atinja os meus objetivos, estando ao meu lado diante de qualquer dificuldade.*

*À minha orientadora, Camila Renata Corrêa, que além de ser uma profissional incrível, é digna de imensa admiração por sua personalidade, caráter e humildade. Como sua orientanda, aprendi que sabedoria não é apenas conhecimento, e sim um misto de experiência, compreensão, respeito e dedicação.*

*À minha co-orientadora, Fabiane Valentini Francisqueti-Ferron, que jamais me desamparou nesse período desafiador, e imensamente enriquecedor. Com sua didática, paciência e sinceridade que as tornam ainda mais sábia, além de tanto conhecimento, fez da minha caminhada mais leve.*

## ***Agradecimentos***

---

Primeiramente, agradeço às Prof<sup>as</sup>. Dra. Camila Renata Corrêa e Dra. Fabiane Valentini Francisqueti-Ferron por todos os ensinamentos, paciência e disposição em me orientar durante toda a realização desse trabalho.

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas, ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana”.

(Carl Jung)

À equipe do Lab RedOx, meus agradecimentos à Carol Cristina Vágula de Almeida Silva, Bruno Henrique de Paula, Felipe Sarzi, Hugo Tadashi Kano, Cristina Schmitt Gregolin e demais membros da equipe por me receberem com estima e, mesmo diante das dificuldades rotineiras desse mundo da pesquisa, sempre se dispuseram em me ajudar. Em especial, agradeço ao Artur Junio Togneri Ferron e Juliana Silva Siqueira por estarem ao meu lado do início ao fim nessa caminhada, obrigada pelos ensinamentos e a amizade que conquistamos nesses dois anos!

À toda equipe da Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEx), que viabilizou a execução desse projeto, auxiliando no biotério e dosagens necessárias.

Aos membros titulares da banca examinadora de qualificação, Dra. Renata de Azevedo Melo Luvizotto Nascimento e Dr. Igor Otavio Minatel pela participação enriquecedora nessa etapa final. Além disso, também sou grata ao Igor por toda confiança, ajuda e indicação a esse programa tão bem-conceituado.

À coordenadora do programa de pós-graduação em Patologia, Dra. Márcia Guimarães da Silva pela dedicação em manter a excelência desse programa. E à secretária deste programa, Vânia do Amaral Soler, por sua imensa disposição e colaboração a todo instante.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

À Patrícia Estela Monteiro Pereira, professora de pilates e docente no Centro Universitário Sudoeste Paulista (UniFSP), que me ofertou palestras para as turmas da graduação nas quais lecionava, encorajando-me ao mundo acadêmico.

À minha professora da graduação, Prof<sup>a</sup>. Dra. Aline Carbonera Luvizon, e minha coordenadora, Prof<sup>a</sup>. Dra. Renata Carolina Piffer, que me concederam oportunidades de palestrar, incentivando ao mestrado.

À minha amiga Tânia Maria Diniz Ianni que, durante o meu estágio na graduação, já me incentivava a seguir a área da pesquisa e a docência no ensino superior.

Aos meus amigos queridos que sempre torceram por mim nessa jornada e se alegram com as minhas árduas vitórias.

**Muito obrigada!**

Por vezes, sentimos que aquilo que  
fazemos não é senão uma gota  
d'água no mar, mas o mar seria  
menor se lhe faltasse uma gota.  
(Madre Teresa de Calcutá)

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1:</b> Mecanismo de supressão da SOCS-3 na ação da leptina.....                    | 21 |
| <b>Figura 2:</b> Comorbidades gerais associadas à obesidade.....                             | 23 |
| <b>Figura 3:</b> Mecanismo de resistência à leptina através da falha em sua sinalização..... | 24 |
| <b>Figura 4:</b> Folhas e fruto da bergamota ( <i>Citrus bergamia</i> ).....                 | 26 |
| <b>Figura 5:</b> Hipótese do trabalho.....   | 34 |
| <b>Figura 6:</b> Gráficos dos indicadores de comorbidades.....                               | 50 |
| <b>Figura 7:</b> Gráficos de obesidade e parâmetros oxidativos e inflamatórios no TAE.....   | 51 |
| <b>Figura 8:</b> Gráficos dos parâmetros oxidativos e inflamatórios hipotalâmicos.....       | 52 |
| <b>Figura 9:</b> Gráficos da via de sinalização da leptina.....                              | 53 |

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1:</b> Composição das rações.....  | 41 |
| <b>Tabela 2:</b> Análises nutricionais, metabólicas e hormonais na 20 <sup>a</sup> semana..... | 48 |
| <b>Tabela 3:</b> Análises nutricionais na 30 <sup>a</sup> semana.....                          | 49 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|         |  |
|---------|--|
| AgRP    | Proteína relacionada à <i>Agouti</i>                   |
| AMPK    | Quinase ativada por adenosina monofosfato              |
| ARC     | Núcleo arqueado  |
| ATP     | Adenosina trifosfato                                   |
| BAT     | <i>Brown Adipose Tissue</i>                            |
| bAT     | <i>Brown-like Adipose Tissue</i>                       |
| DNPB    | Dinitrofenilhidrazina                                  |
| EDTA    | Ácido etilenodiaminotetracético                        |
| EROs    | Espécies reativas de oxigênio                          |
| HOMA-IR | <i>Homeostases Model Assessment-Insulin Resistance</i> |
| HSF     | <i>High Sugar Fat</i>                                  |
| IA      | Índice de adiposidade                                  |
| IL      | Interleucina   |
| IMC     | Índice de massa corporal                               |
| JAK     | Janus quinase  |
| kDa     | Quilodalton  |
| LDL     | Lipoproteína de baixa densidade                        |
| LEPR-B  | <i>Leptin receptor long isoform</i>                    |
| LPS     | Lipopolissacarides                                     |
| MAPK    | Proteíno-quinases ativadas por mitógenos               |
| MC3R    | Melanocortina 3  |
| MC4R    | Melanocortina 4  |
| MDA     | Malondialdeído   |
| NF-kB   | Fator de transcrição nuclear                           |
| NPY     | Neuropeptídeo Y  |
| OMS     | Organização mundial da saúde                           |
| PBS     | <i>Phosphate-buffered saline</i>                       |
| PI3K    | Fosfoinosítido 3-quinase                               |
| PKB     | Proteína quinase B                                     |
| POMC    | Pró-opiomelanocortina                                  |
| PPAR    | <i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>      |
| PTP     | <i>Protein-tyrosine-phosphatase</i>                    |
| RE      | Retículo Endoplasmático                                |
| ROS     | <i>Reactive oxygen species</i>                         |
| SNC     | Sistema nervoso central                                |

|               |   |
|---------------|---|
| SOCS          | <i>Supressor of cytokine signaling</i>                    |
| STAT          | <i>Signal transducers and activators of transcription</i> |
| TA            | Tecido adiposo  |
| TAE           | Tecido adiposo epididimal                                 |
| TBA           | Ácido tiobarbitúrico                                      |
| TLR           | <i>Toll like receptors</i>                                |
| TNF           | Fator de necrose tumoral                                  |
| UCP           | <i>Uncoupling protein</i>                                 |
| WAT           | <i>White adipose tissue</i>                               |
| $\alpha$ -MSH | Melanocortina $\alpha$                                    |

## Sumário

|  |    |
|--|----|
| <b>Capítulo 1 - Revisão de literatura</b> .....  | 14 |
| Visão geral da obesidade.....  | 15 |
| Tecido adiposo.....  | 16 |
| Leptina e a resistência na Obesidade .....   | 19 |
| Bergamota ( <i>Citrus bergamia</i> ).....  | 25 |
| Referências bibliográficas .....   | 28 |
| <br>   |    |
| Justificativa e Hipótese .....   | 34 |
| Objetivo.....  | 35 |
| <br>   |    |
| <b>Capítulo 2 - Artigo científico</b> .....  | 36 |
| Efeito terapêutico do extrato das folhas de Bergamota ( <i>Citrus bergamia</i> )<br>sobre a resistência à leptina em modelo experimental de obesidade<br>induzida por dieta rica em açúcar e gordura ..... | 37 |
| <br>   |    |
| <b>Conclusão</b> .....   | 56 |

## Resumo

A obesidade, decorrente do consumo de dietas ricas em açúcar e gordura, induz à inflamação e estresse oxidativo que, ao atingirem o hipotálamo, alteram a sinalização da leptina. A bergamota (*Citrus bergamia*), apresenta ação antioxidante e anti-inflamatória com benefícios comprovados em algumas doenças metabólicas. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito terapêutico do extrato de folhas de bergamota sobre a resistência à leptina em modelo experimental de obesidade induzida por dieta rica em açúcar e gordura. Ratos Wistar machos (n=28) foram distribuídos em 2 grupos para receberem dieta controle (C, n=14 animais) e dieta rica em açúcar e gordura (HSF, n=14 animais) por 20 semanas. No fim desse período, foi detectada diferença estatística nos níveis plasmáticos de leptina entre os grupos; assim, os animais foram subdivididos em 4 grupos; no grupo controle, 7 animais receberam a dieta controle com tratamento placebo (C, n=7) e outros 7 animais receberam a dieta controle com extrato das folhas de bergamota (C+B, n=7). A mesma distribuição ocorreu no grupo HSF, mantendo a dieta rica em açúcar e gordura e água com sacarose, 7 animais receberam tratamento placebo (HSF, n=7) e outros 7 animais receberam o extrato de folhas de bergamota (HSF+B, n=7). Esse procedimento foi realizado por 10 semanas. A administração desse extrato, diluído em água potável, foi realizada diariamente por gavagem, na concentração de 50 mg/Kg de peso, o placebo foi composto apenas com água potável e administrado da mesma forma. Foram avaliados parâmetros nutricionais (peso, ingestão de ração e água e calorias ingeridas), índice de adiposidade, concentração de adipocitocinas pró-inflamatórias, indicadores do estresse oxidativo no tecido adiposo e hipotálamo e comorbidades como glicemia, triglicérides, insulina, leptina e resistência insulínica pelo cálculo do HOMA-IR. Foi realizada a análise de variância (ANOVA) de duas vias, considerando valor de  $p < 0,05$ . Para comparação entre todos os grupos, as variáveis estatisticamente significativas foram submetidas ao teste *post-hoc* de Tukey. Ao término do experimento, os animais do grupo HSF + B, apresentaram melhora da inflamação e do estresse oxidativo no hipotálamo e no tecido adiposo, diminuição da glicemia, triglicérides e HOMA-IR. Os níveis de leptina plasmáticos também reduziram com o tratamento do extrato. Sendo assim, diante desses resultados, podemos concluir que o extrato das folhas de bergamota se apresenta efetivo sobre a resistência à leptina associada à obesidade.

**Palavras chave:** obesidade; resistência leptina; bergamota

## Abstract

Obesity, resulting from the consumption of diets rich in sugar and fat, induces inflammation and oxidative stress that, upon reaching the hypothalamus, alter the functions of leptin. The suggested mechanism is the failure in the phosphorylation of this hormone, caused by the excessive production of reactive oxygen species and pro-inflammatory cytokines, a characteristic feature of excess fat mass. Bergamot (*Citrus bergamia*), has antioxidant and anti-inflammatory action with providing benefits in some metabolic diseases. The aim of this study was to evaluate the therapeutic effect of bergamot leaf extract on leptin resistance in an experimental model of obesity induced by a diet high in sugar and fat. Male Wistar rats (n=28) were divided into 2 groups to receive a control diet (C, n=14 animals) and a high sugar and fat diet (HSF, n=14 animals) for 20 weeks. At the end of this period, a statistical difference was detected in plasma leptin levels between the groups; thus, the animals were subdivided again into 4 groups; in the control group, 7 animals received the control diet with placebo treatment (C, n=7) and another 7 animals received the control diet with bergamot leaf extract (C+B, n=7). The same distribution occurred in the HSF group, maintaining a diet rich in sugar and water with sucrose, 7 animals received placebo treatment (HSF, n=7) and another 7 animals received bergamot leaf extract (HSF+B, n=7). This procedure was performed for 10 weeks. The administration of this extract, diluted in drinking water, was performed daily by gavage at a concentration of 50 mg/Kg of weight. The placebo was composed only with drinking water and administered in the same way. Nutritional parameters (weight, feed and water intake and calories ingested), adiposity index and concentration of pro-inflammatory adipocytokines and indicators of oxidative stress in adipose tissue and hypothalamus and comorbidities such as blood glucose, triglycerides, insulin, leptin and insulin resistance were evaluated by calculating the HOMA-IR. Two-way analysis of variance (ANOVA) was performed, considering a p-value < 0.05. For comparison between all groups, the statistically significant variables were submitted to Tukey's post-hoc test. At the end of the experiment, the animals that received the treatment with bergamot leaf extract, showed improvement in inflammation and oxidative stress in the hypothalamus and adipose tissue. In the metabolic and nutritional parameters, a decrease in blood glucose, triglycerides and HOMA-IR can also be observed. Plasma leptin levels also reduced with extract treatment. Thus, given these results, we can conclude that the extract of bergamot leaves is effective on leptin resistance associated with obesity.

**Keywords:** obesity; leptin resistance; bergamot

# ***Capítulo 1 - Revisão de literatura***

---

## Visão geral da obesidade

A obesidade, doença que se tornou pandêmica nas últimas décadas, é definida como o acúmulo excessivo de gordura corporal que pode acarretar prejuízos à saúde (1). A Organização Mundial da Saúde (OMS) identifica o quadro de obesidade baseado no índice de massa corporal (IMC), calculado através da relação entre o peso corpóreo (Kg) e a estatura ( $m^2$ ) do indivíduo. Os resultados iguais ou superiores a  $30 \text{ Kg}/m^2$  são classificados como obesos e subdivididos em diferentes estágios, os quais são caracterizados como grau I (moderado excesso de peso, IMC entre  $30 - 34,9 \text{ Kg}/m^2$ ), grau II (obesidade leve ou moderada, IMC entre  $35 - 39,9 \text{ Kg}/m^2$ ) e grau III (obesidade mórbida, o IMC excede  $40 \text{ Kg}/m^2$ ) (2). No cenário mundial, a estimativa é de que 2,3 bilhões de pessoas sejam acima do peso, e 700 milhões sejam obesas em 2025 (3). O crescimento exponencial dessa doença se deve a modificação no estilo de vida decorrente da industrialização e urbanização, especialmente nas sociedades ocidentais acarretando sobrecarga nos sistemas de saúde (4).

Dentre os fatores etiológicos da obesidade estão condições psicossociais, ecológicas, socioeconômicas, genéticas, hormonais e culturais (5). No entanto, a principal causa fundamental envolve o desequilíbrio entre a energia ingerida e o gasto energético, condição que favorece o aumento dos estoques de gordura no tecido adiposo desencadeando ampliação da massa adiposa, conseqüentemente, a obesidade (6). Diversos mecanismos têm sido apontados como consequência negativa da expansão da gordura corporal, dentre eles a inflamação (1) e o estresse oxidativo (5). Esses dois fenômenos são considerados pilares no desenvolvimento das complicações e comorbidades, que acompanham essa doença. Sendo assim, compreender as características e funções do tecido adiposo é de extrema relevância para que em um futuro próximo, intervenções possam ser

empregadas para um possível retardamento ou prevenção nas manifestações de suas complicações e comorbidades.

## **Tecido adiposo**

O tecido adiposo (TA) é um órgão complexo que exerce diversas funções no âmbito celular, tecidual e sistêmico. É constituído basicamente por adipócitos, pré-adipócitos, células do sistema imunológico, fibroblastos e células do endotélio vascular (7). Em mamíferos, esse tecido é subdividido em três tipos que são classificados de acordo com a sua coloração, assim temos o tecido adiposo branco (*White adipose tissue – WAT*), marrom (*Brown Adipose Tissue - BAT*) e bege (*Brown-like Adipose Tissue – bAT*) (8).

O WAT representa a maior parte da massa tecidual adiposa nos seres humanos, encontrado em áreas viscerais, subcutâneas e regiões gluteofemorais, com importante função no armazenamento de triglicérides e mobilização de energia (9). Outro papel essencial atribuído a ele, é referente a sua atividade endócrina, por secretar diversas substâncias conhecidas como adipocinas; dentre elas estão a adiponectina, leptina, glicocorticoides, angiotensina, resistina, fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$ , interleucina (IL)-6, ácidos graxos livres, entre outras (10). Dessa forma, a partir da ação dessas substâncias produzidas por ele, esse tecido possui a capacidade de participar da função fisiológica de diversos processos como a regulação do apetite, manutenção do peso corpóreo, no sistema de coagulação, angiogênese, fibrinólise, imunidade, controle do tônus vascular e metabolismo de lipídios (11).

O tecido adiposo marrom dispõe de 4,3% da massa adiposa total, sendo predominantemente localizado em regiões supraclaviculares e interescapular (12). Diferente do WAT, os adipócitos marrons são mais vascularizados e inervados, com ação voltada à termogênese, por serem

ricos em mitocôndrias (13). Essas organelas, através da proteína desacopladora 1 (*uncoupling protein* - UCP1) oxidam lipídios para gerar calor, tornando esse tecido com função oxidativa, possibilitando o aumento da taxa metabólica e do gasto energético (7).

Recentemente, tem-se estudado um novo tipo de tecido adiposo conhecido como tecido adiposo bege e sua capacidade de transdiferenciação ou "*brown conversion*", o qual apresenta características intermediárias entre o WAT e BAT, com comportamento semelhante ao WAT referente ao armazenamento de excesso de energia, porém com ação termogênica quando há o aumento da função mitocondrial e da expressão de UCP1 (7). Sendo assim, sua característica varia de acordo com as condições metabólicas, pois mesmo apresentando baixa quantidade de UCP1, se comparado com o BAT, são altamente reativas sob estimulação (1), tornando-se um alvo terapêutico para obesidade e doenças metabólicas. O bAT representa 3,1% da gordura corporal total em homens adultos e 7,5% em mulheres (14). Pesquisadores observaram adipócitos característicos de tecido adiposo bege, na região supraclavicular, no entanto, ainda são escassos os estudos sobre essa coloração de tecido. Evidências apontam que a exposição ao frio pode estimular o aumento da expressão gênica de UCP1 na gordura subcutânea, favorecendo a transição de tecido branco para bege (15).

Com essa explanação sobre a função e as características dos tipos de tecido adiposo, podemos atribuir que, em condições fisiológicas, é um órgão complexo e fascinante com importante papel no funcionamento fisiológico. A literatura descreve que diante de um desequilíbrio onde ocorre aumento da ingestão calórica e a diminuição do gasto energético, o tecido adiposo se expande pelos mecanismos de hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos. Essa expansão torna esse órgão disfuncionante trazendo diversas complicações, pois é o gatilho inicial para o desenvolvimento fisiopatológico dos distúrbios relacionados à obesidade (16,17).

Em um cenário de disfunção do tecido adiposo, característico da obesidade, há alterações no metabolismo de lipídios, redução do fluxo sanguíneo tecidual, menor expressão de genes angiogênicos e baixa densidade capilar acarretando a falta de suprimento de oxigênio com possível necrose tecidual (18). Além disso, principalmente devido à hipertrofia, ocorre o aumento da produção de alguns hormônios, citocinas pró-inflamatórias, espécies reativas de oxigênio, implicando em um processo inflamatório e de desequilíbrio do sistema redox, os quais se tornam sistêmicos com a cronicidade desse processo (19). No entanto, estudos relatam que a expansão do tecido adiposo por hiperplasia não necessariamente induz o aumento do risco de doenças metabólicas e cardiovasculares, sendo a hipertrofia adipocitária um fator mais relevante para a fisiopatologia dessas doenças associadas à obesidade, já que promovem uma sobrecarga nos adipócitos. Esse fato possivelmente explica a proporção sutil de indivíduos obesos que não apresentam comorbidades e síndrome metabólica (18,19).

Pesquisas apontam que além da hipertrofia e hiperplasia, o alto consumo de ácidos graxos saturados, também pode contribuir para disfunção do tecido adiposo e manifestação de comorbidades. O mecanismo envolvido é que esse tipo de gordura pode ativar os receptores Toll-like (TLRs) por apresentarem a mesma composição transmembrana das bactérias, lipopolissacarídeos (LPS) (20). Esses receptores são expressos em macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e adipócitos, e quando ativados, acionam a resposta imune inata produzindo citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas de oxigênio, potencializando o quadro inflamatório e o desequilíbrio redox (21). A ativação desses mecanismos ocorre através do recrutamento de quinases associadas ao receptor de IL-1 $\beta$  para ativar o receptor de TNF, que conseqüentemente promove ativação do complexo IKK e, assim, ocorre a fosforilação do I $\kappa$ B e a sua degradação resulta no fator de transcrição nuclear (NF- $\kappa$ B) que, no núcleo, induz a

liberação de citocinas pró-inflamatórias. Nesse sentido, podemos definir que a inflamação oriunda da obesidade desencadeada pelos fatores descritos acima, é uma metainflamação, uma vez que é desencadeada por fatores metabólicos e não por agentes patogênicos (22). Acompanhado da metainflamação, outra adipocina que sofre alteração em sua secreção decorrente da expansão do TA é a leptina, conhecida como o hormônio que atua no controle da fome (23).

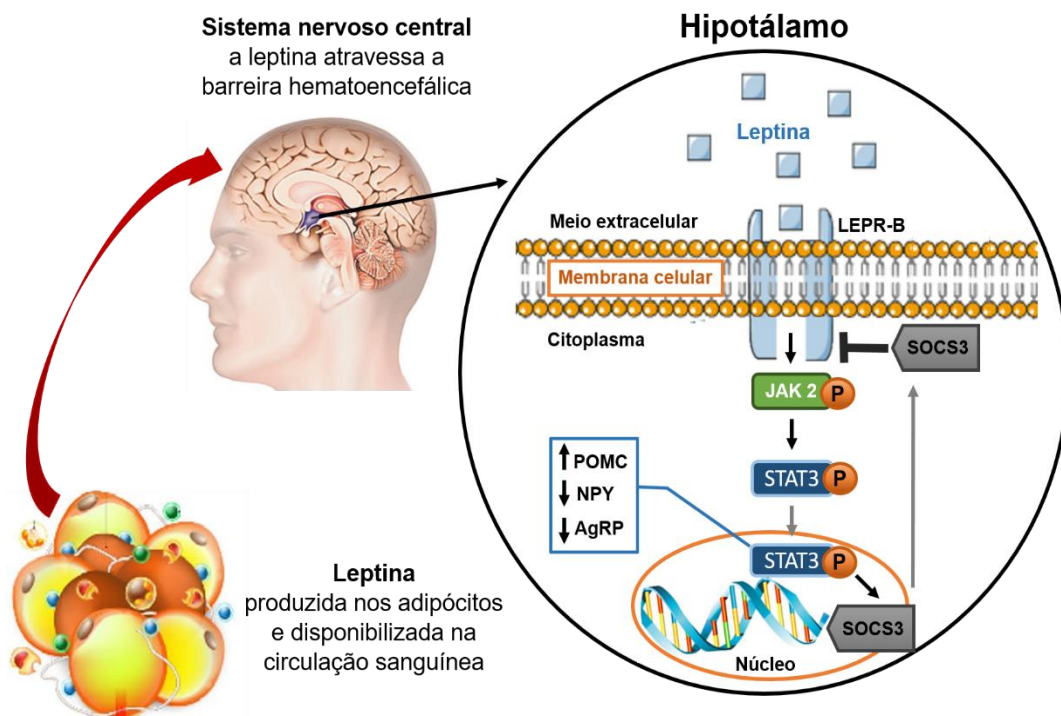
### **Leptina e a resistência na Obesidade**

A leptina (do grego *leptos* = magro) é uma proteína constituída de 167 resíduos de aminoácidos, com peso molecular de aproximadamente 16 kDa, tendo seu gene localizado no cromossomo 7q31 em seres humanos. Trata-se de uma das primeiras adipocinas descobertas através de pesquisas científicas realizadas no laboratório de Jeffrey Friedman em 1994, na universidade Rockefeller em Nova Iorque (24).

Esse hormônio está envolvido em vários processos fisiológicos, com importante papel no metabolismo de glicose e gorduras, no sistema imunológico, reprodutor, cardiovascular e inclusive no controle do sistema hematopoiético, porém sua atribuição mais relevante está na regulação do consumo de alimentos e na homeostasia energética (25).

A leptina é produzida principalmente pelos adipócitos e sua maior liberação ocorre durante a noite e nas primeiras horas do dia, com tempo de meia vida plasmática de 30 minutos. Sua secreção é estimulada pela insulina e outros peptídeos gástricos como, por exemplo, a grelina, logo após a ingestão alimentar (26). Ao ser produzida no tecido adiposo, a leptina é disponibilizada na corrente sanguínea e sua ação, em mamíferos, ocorre principalmente no hipotálamo, sistema nervoso central (SNC). Ao atravessar a barreira hematoencefálica, a leptina se liga aos receptores específicos de cadeia longa, denominados ObRb ou LEPR-B (*Leptin*

*Receptor Long Isoform*), os únicos que possuem todos os domínios de proteínas necessários para a sinalização (27,28). Após a ligação da leptina ao seu domínio extracelular, há ativação da JAK2 (Janus quinase-2), que fosforila outros resíduos de tirosina (Tyr985, Tyr 1077 e Tyr1138), assim ativando *signal transducers and activators of transcription* (STAT3), o qual se transloca para o núcleo e inicia a transcrição de genes alvo, ativando os neurônios pró-opiomelanocortina (POMC) que inibem a atividade orexígena de neuropeptídeo Y (NPY) e proteína relacionada à *Agouti* (AgRP), resultando na inibição do apetite e aumento do gasto energético (29). Ademais, a ativação de POMC induz a expressão e secreção de peptídeos derivados do hormônio estimulador de melanócitos-alfa ( $\alpha$ -MSH), os quais são liberados em terminais do axônio e se ligam aos receptores de melanocortina 3 e 4 (MC3R e MC4R), que também modulam o gasto energético e o consumo alimentar, respectivamente (30). Além disso, a partir da translocação nuclear de STAT3, também ocorre a transcrição do *supressor of cytokine signaling 3* (SOCS-3) que inibe os receptores LEPR-B, atuando como um sinalizador negativo para ação da leptina, controlando a ação desse hormônio (Figura 1) (26,31). Ainda nesse feedback negativo, há participação de outra molécula com importante papel no metabolismo da leptina e insulina, a proteína tirosina fosfatase 1B (*Protein tyrosine phosphatase 1B* - PTP1B) (24), estando envolvida em uma série de atividades enzimáticas transcricionais e translacionais, e pode ser alterada por processos de oxidação e fosforilação. Essa proteína permanece restrita à região citoplasmática, próxima ao retículo endoplasmático, por conter segmentos C-terminal hidrofóbicos (32).



**Figura 1.** Mecanismo fisiológico da SOCS-3 no controle da ação da leptina. Ao ser produzida pelos adipócitos e disponibilizada na circulação sanguínea, a leptina atravessa a barreira hematoencefálica e age no hipotálamo, em receptores LEPR-B, ativando a JAK2 que fosforila resíduos de tirosina e recruta STAT3, o qual se transloca para o núcleo e inicia a transcrição de genes anorexígenos e SOCS3, que exerce ação inibitória ao receptor de leptina, controlando a ação desse hormônio.

No ambiente extracelular, o MC3R é expresso na placenta, intestino, timo, TA e principalmente no SNC. A literatura sugere que o MC3R expresso pelo TA tenha influência no aumento do gasto energético e na lipólise mediados pelo  $\alpha$ -MSH, relata-se também sobre a evidência de seu efeito auto-regulatório por ser expresso nos neurônios POMC e NYP/AGRP (33). O MC4R é encontrado sobretudo no hipotálamo, sendo ativado pelo  $\alpha$ -MSH, e atua reduzindo o consumo alimentar. Mutações nesse receptor representam o distúrbio genético mais comum de obesidade humana de início precoce, e sua inativação resulta em obesidade associada a hiperfagia, hiperinsulinemia e hiperglicemia (27).

Para mais, há evidências sobre a ação da leptina na regulação

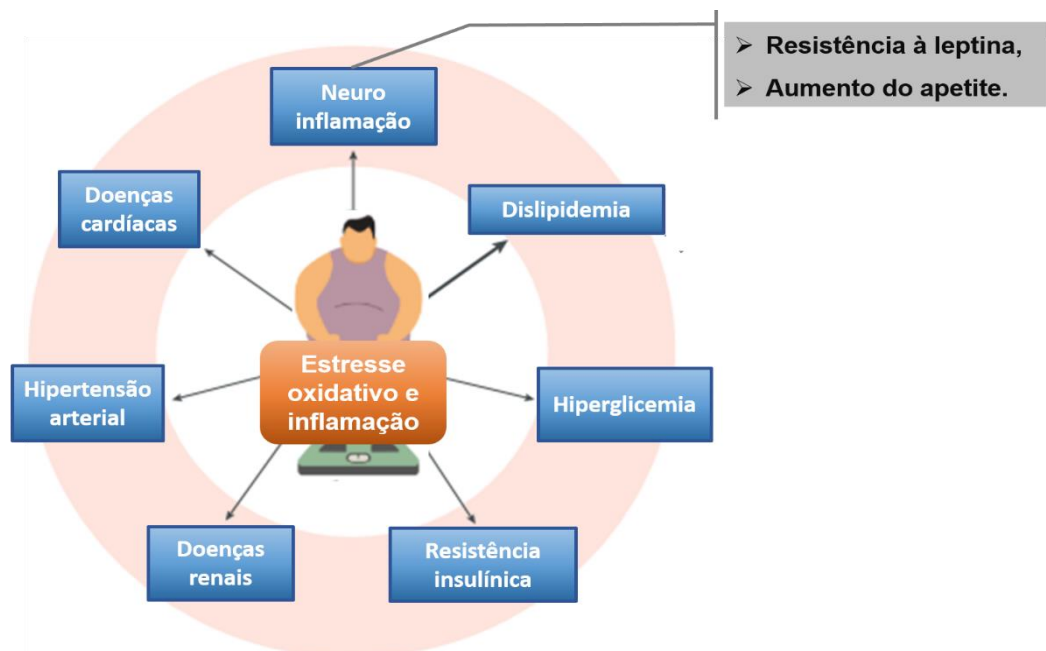
energética via estimulação da perda de energia sob forma de calor, induzida pelo sistema nervoso simpático ou tireoide, por meio da expressão de proteínas desacopladoras da mitocôndria (UCP-1), do tecido adiposo branco (UCP-2) e/ou do músculo (UCP-3), as quais favorecem a termogênese, desacoplando a cadeia transportadora de elétrons da síntese de adenosina trifosfato (ATP) (34).

As concentrações de leptina são correspondentes ao volume de células adiposas, e aumentam proporcionalmente ao percentual de gordura corporal. Adicionalmente, fatores como a idade, o gênero, a rotina de exercício físico, a ingestão calórica e o Índice de Massa Corporal (IMC) também interferem nas concentrações de leptina (26). Sendo assim, visto que obesos apresentam maior concentração plasmática desse hormônio, deveriam apresentar maior controle sobre os mecanismos de fome e saciedade. No entanto, tal ação esperada não acontece e, embora esse mecanismo não tenha sido totalmente elucidado, apontam-se alguns fatores que colaboram para esse cenário (35), como a ausência de interação entre a leptina e seus receptores-alvo por deficiência no seu transporte através da barreira hematoencefálica, dessensibilização do receptor por exposição crônica ao aumento de leptina plasmática ou uma falha em sua sinalização devido à superexpressão de reguladores inibitórios, levando a uma exposição crônica de hiperleptinemia que caracteriza o quadro de resistência à leptina (27,36).

Em condições de obesidade, induzida por dieta rica em açúcar e gordura, os mecanismos mais prováveis relacionados a essa resistência hormonal são a inflamação e o estresse oxidativo. A princípio, o consumo de dieta rica em gordura contribui amplamente para esse cenário, já que os ácidos graxos saturados presentes nessa dieta são capazes de causar estresse do retículo endoplasmático (RE) por ativação de TLR (37) estimulando o fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) a produzir citocinas pró-inflamatórias. Nesse contexto, o RE é considerado uma estrutura chave por

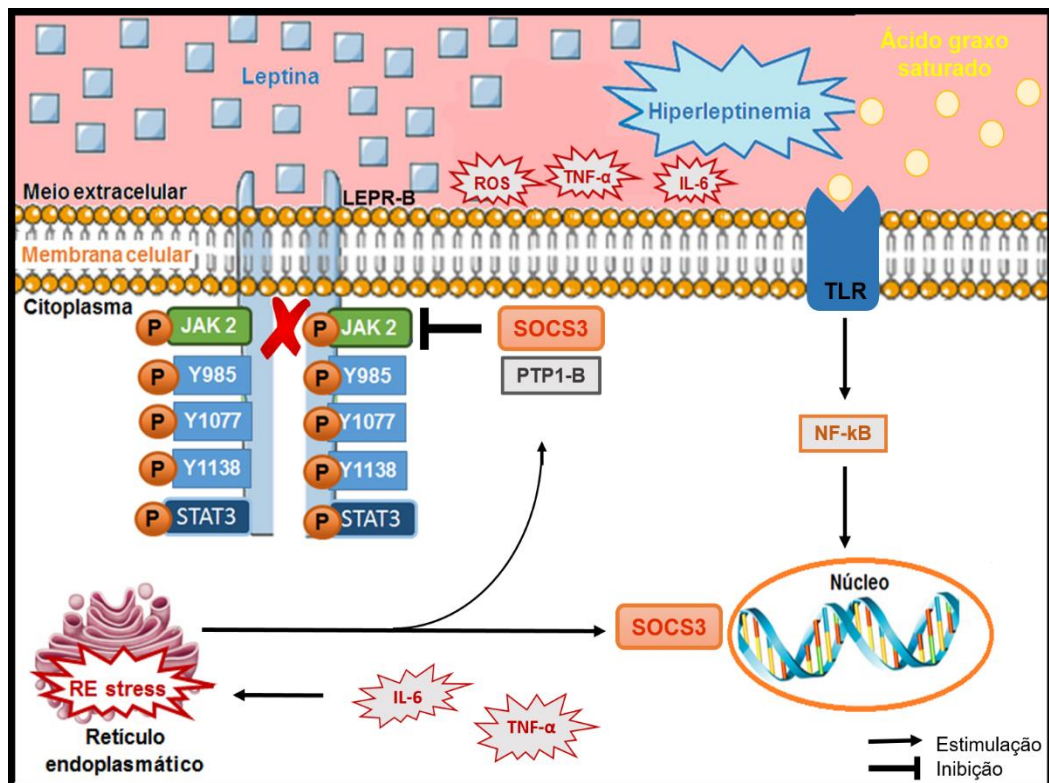
regular a síntese de proteínas, metabolismo de lipídeos, gliconeogênese e sinalização de cálcio, assim tendo um impacto direto na obesidade (38,39). O acúmulo de colesterol no RE, advindo dessa dieta, possivelmente afeta as proteínas transmembranas da célula, permitindo que as citocinas pró-inflamatórias presentes no hipotálamo amplifiquem a inflamação intracelular que, juntamente com o desequilíbrio redox, contribuem para o estresse do RE e alteração das funções dessa organela, fator este que induz à superexpressão de SOCS-3 e inibição da sinalização do receptor de leptina (40,41).

Com o aumento do peso, o estado inflamatório e pró-oxidante se encontram ativos e estão constantemente se retroalimentando. À vista disso, estudos têm relacionado a obesidade com o estresse do RE que também se relaciona com as outras complicações (Figura 2), como a resistência à leptina e insulina, inflamação crônica de baixo grau e desequilíbrio energético, colaborando para o agravamento da própria obesidade (41,42).



**Figura 2.** Comorbidades gerais associadas à obesidade, advindos do cenário inflamatório e pró-oxidativo, com ênfase na neuroinflamação que está associada ao quadro de resistência à leptina e conseqüente aumento do apetite.

Para consolidar esse mecanismo, estudos demonstraram que há aumento da expressão de SOCS3 no núcleo arqueado de animais submetidos à dieta rica em gordura, e a sua superexpressão induz a resistência à leptina, obesidade e intolerância à glicose. Em contrapartida, a deleção dessa proteína em neurônios combate a obesidade induzida por dieta (26,27). O estresse do RE e o aumento sistêmico de citocinas pró-inflamatórias também promovem a expressão de *protein-tyrosine-phosphatase 1* (PTP1)-B no hipotálamo, que inibe a sinalização pela leptina e insulina por desfosforilar moléculas sinalizadoras, como a JAK2 (Figura 3). Sendo assim, baixos níveis da proteína PTP1-B favorecem a atividade relacionada à leptina e melhora tal sensibilidade hipotalâmica, combatendo o quadro de obesidade induzida por dieta (43,44).



**Figura 3.** Mecanismo de resistência à leptina através da falha em sua sinalização. Na obesidade, os ácidos graxos saturados presentes na dieta hiperlipídica ativam TLR, que estimulam NF-κB a produzir citocinas pró-inflamatórias, causando estresse do RE. Por sua vez, esse estresse promove a superexpressão de SOCS3 e PTP1-B, ambos reguladores negativos de JAK2, bloqueando a sinalização do receptor de leptina, assim resultando em hiperleptinemia.

Outro fator relacionado a essa condição é a sinalização de IL-6, uma glicoproteína importante ao sistema imunológico que atua na diferenciação celular em resposta às inflamações sistêmicas, afetando o metabolismo lipídico, resistência insulínica e atividade mitocondrial, interferindo também no sistema neuroendócrino (45). Com a sinalização de IL-6, há ativação de JAK e, conseqüentemente, de diversas vias de sinalização intracelular, visto que a estimulação da via IL-6/JAK/STAT3 influencia na transcrição de genes envolvidos na proliferação, diferenciação, recrutamento e sobrevivência, denota-se essencial o papel da SOCS3 na modulação dessa via. Ainda, após a ligação de IL-6 com seus receptores, há ativação da via JAK/MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno) que ativa fatores de transcrição envolvidos no aumento da síntese de proteínas. Além disso, a IL-6 induz a ativação da via Akt/PKB (proteína quinase B), através da cascata de fosforilação envolvendo PI3K (Fosfoinosítideo 3-quinase), capaz de modular a expressão de genes que atuam na sobrevivência celular, assim associando a sinalização de IL-6 com diversas doenças inflamatórias (46).

Na tentativa de minimizar esses efeitos negativos da inflamação e do estresse oxidativo na obesidade, o uso de compostos bioativos com atividades antioxidantes e anti-inflamatórias tem sido cada vez mais investigada (47,48).

### **Bergamota (*Citrus bergamia*)**

A bergamota (Figura 4) é um citrus encontrado no Sul da Itália, na região da Calábria, e também no Brasil na região de Cordeirópolis, São Paulo. Assim como outros citrus, a bergamota contém óleos essenciais, pectinas, pigmentos, ceras, cumarinas, psoralenos e polifenóis. Seu fruto é utilizado principalmente para a extração dos óleos essenciais voltado à indústria cosmética, enquanto que seu suco é pouco consumido por

apresentar sabor amargo (49). Porém, nos últimos anos, seu significativo teor de flavonoides tem despertado a atenção de pesquisadores por apresentar potencial atividade antioxidante e anti-inflamatória (50).



**Figura 4.** Folhas e fruto da bergamota (*Citrus bergamia*).

**Fonte:** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), Cruz das Almas - Bahia, Brasil.

Flavonoides são compostos polifenólicos amplamente presentes no reino vegetal, sendo uma classe de metabólitos secundários que desempenham importantes funções para a sobrevivência da planta, como atrair polinizadores, combater estresses e infecções ambientais, além de regular o crescimento celular (51). A estrutura dos flavonoides é composta por dois anéis benzênicos ligados por um anel heterocíclico contendo oxigênio. Esses compostos podem ser categorizados em diferentes subclasses dependendo das ligações químicas realizadas em sua estrutura, classificando-as como flavanois, flavanonas, flavonas, isoflavonas, flavonois e antocianidinas. No geral, os flavonoides são metabolizados no intestino e no fígado, mas a sua biodisponibilidade varia de acordo com cada subclasse, oferecendo diversos efeitos benéficos para a saúde humana (52).

À vista disso, estudos relatam sobre efeitos hipolipêmico e hipoglicêmico da bergamota (49,53) mostrando-se eficaz no tratamento dos

parâmetros que compõem a síndrome metabólica. Esse benefício é atribuído ao perfil polifenólico do suco dessa fruta, contendo uma série de flavanonas e flavonas que não são encontradas na laranja e no limão. Sendo assim, dentre os polifenóis mais importantes, estão as flavanonas, como a naringina, neohesperidina, neoeriocitrina e glicosídeo de eriodictiol; e as flavonas, apigenina, luteolina, crisoeriol e glicosídeos de diosmetina (54). Além destes, também foram identificados derivados de flavonoides diglicosilados como a melitidina e brutieridina, cuja estrutura química se assemelha a das estatinas, assim comprovando que a bergamota difere dos demais citrus tanto pela sua composição quanto pelo elevado teor desses compostos (49,55).

Outros trabalhos experimentais também observaram efeitos benéficos do suco do fruto de bergamota sobre parâmetros metabólicos em animais submetidos a dietas obesogênicas, dentre os quais, prevenção da hiperlipidemia, sugerindo que esse consumo promove a redução do risco de doenças cardiovasculares (56). Ao mesmo passo, Musolino e colaboradores demonstraram uma melhora da resistência periférica à insulina, juntamente com uma melhora da função hepática em camundongos submetidos à dieta ocidental (57). No entanto, estudos analíticos mostram que para algumas plantas, como as que produzem bagas, a composição fenólica da folha é semelhante a do fruto ou até mesmo mais rica, apresentando potencial utilização como fonte alternativa para o desenvolvimento de suplementos alimentares, nutracêuticos ou alimentos funcionais (58,59). Baseado nisso, um estudo caracterizando os compostos bioativos presentes no extrato de folhas e fruto da bergamota, mostrou que as folhas possuem uma quantidade maior de polifenóis além de apresentarem uma maior capacidade antioxidante e anti-inflamatória *in vitro* (54). Sendo assim, uma vez que não há trabalhos *in vivo* envolvendo a ação do extrato das folhas da bergamota no tratamento da inflamação e do estresse oxidativo em obesidade e comorbidades, uma investigação

torna-se relevante. Resultados positivos podem vislumbrar um produto sustentável, com ação farmacológica para sanar danos encontrados na obesidade impedindo complicações.

## Referências bibliográficas

1. Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C, et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 2014;384(9945):766–81.
2. Chooi YC, Ding C, Magkos F. The epidemiology of obesity. *Metabolism* [Internet]. 2019;92:6–10. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.09.005>
3. Mapa da Obesidade - Abeso [Internet]. [cited 2022 Feb 10]. Available from: <https://abeso.org.br/obesidade-e-sindrome-metabolica/mapa-da-obesidade/>
4. Kopp W. How western diet and lifestyle drive the pandemic of obesity and civilization diseases. Vol. 12, *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*. 2019. p. 2221–36.
5. Di Domenico M, Pinto F, Quagliuolo L, Contaldo M, Settembre G, Romano A, et al. The Role of Oxidative Stress and Hormones in Controlling Obesity. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019;10(August):1–13.
6. Tomiyama AJ. Stress and Obesity. *Annu Rev Psychol*. 2019;70:703–18.
7. Raposo HF. Adipose tissue : its colors and versatility. 2020;45(1):1–12.
8. Steven BH, Thomas AW. Mechanisms, Pathophysiology, and Management of Obesity.pdf. 2017.
9. Priest C, Tontonoz P. Inter-organ cross-talk in metabolic syndrome. *Nat Metab* [Internet]. 2019;1(12):1177–88. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s42255-019-0145-5>

10. Csige I, Ujvárosy D, Szabó Z, Lorincz I, Paragh G, Harangi M, et al. The Impact of Obesity on the Cardiovascular System. *J Diabetes Res*. 2018;2018:12.
11. Grigoras A, Amalinei C, Balan RA, Giusca SE, Caruntu ID. Perivascular adipose tissue in cardiovascular diseases-an update. Vol. 22, *Anatolian Journal of Cardiology*. 2019. p. 219–31.
12. Bartelt A, Heeren J. Adipose tissue browning and metabolic health. *Nat Rev Endocrinol*. 2014;10(1):24–36.
13. Perdikari A, Leparc GG, Balaz M, Pires ND, Lldell ME, Sun W, et al. *BATLAS Deconvoluting Brown Adipose Tissue.pdf*. 2018.
14. Halpern B, Mancini MC, Halpern A. Brown adipose tissue: What have we learned since its recent identification in human adults. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2014;58(9):889–99.
15. Suchacki KJ, Stimson RH. Nutritional regulation of human brown adipose tissue. Vol. 13, *Nutrients*. 2021.
16. White U, Ravussin E. Dynamics of adipose tissue turnover in human metabolic health and disease. Vol. 62, *Diabetologia*. 2019. p. 17–23.
17. Amorim RG, Guedes G da S, Vasconcelos SM de L, Santos JC de F. Kidney disease in diabetes mellitus: Cross-linking between hyperglycemia, redox imbalance and inflammation. *Arq Bras Cardiol*. 2019;112(5):577–87.
18. Goossens GH, Blaak EE. Adipose tissue dysfunction and impaired metabolic health in human obesity: A matter of oxygen? *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2015;6(APR):1–5.
19. Ghaben AL, Scherer PE. Adipogenesis and metabolic health | Enhanced Reader [Internet]. 2019. Available from: moz-extension://3dca473d-faab-e94b-8490-a5e8eae653b2/enhanced-reader.html?openApp&pdf=https%3A%2F%2Fwww.nature.com%2Farticles%2Fs41580-018-0093-z.pdf
20. Jayarathne S, Koboziev I, Park OH, Oldewage-Theron W, Shen CL, Moustaid-Moussa N. Anti-Inflammatory and Anti-Obesity Properties of Food Bioactive Components: Effects on Adipose Tissue. *Prev Nutr Food Sci*. 2017;22(4):251–62.

21. Kumar V. Toll-like receptors in the pathogenesis of neuroinflammation. *J Neuroimmunol.* 2019;332(March):16–30.
22. Samuel VT, Shulman GI. Mechanisms for insulin resistance: Common threads and missing links. *Cell [Internet].* 2012;148(5):852–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.017>
23. Pérez-Pérez A, Sánchez-Jiménez F, Vilariño-García T, Sánchez-Margalet V. Role of leptin in inflammation and vice versa. Vol. 21, *International Journal of Molecular Sciences.* 2020. p. 1–24.
24. Gruzdeva O, Borodkina D, Uchasova E, Dyleva Y, Barbarash O. Leptin resistance: Underlying mechanisms and diagnosis. *Diabetes, Metab Syndr Obes Targets Ther.* 2019;12:191–8.
25. Trinh T, Broxmeyer HE. Role for Leptin and Leptin Receptors in Stem Cells During Health and Diseases.pdf. 2021. p. 511–22.
26. Cui H, López M, Rahmouni K. The cellular and molecular bases of leptin and ghrelin resistance in obesity. *Nat Rev Endocrinol [Internet].* 2017;13(6):338–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2016.222>
27. Engin A. Diet-Induced Obesity and the Mechanism of Leptin Resistance. *Med Biol [Internet].* 2017;960. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-48382-5>
28. Shin MK, Eraso CC, Mu YP, Gu C, Yeung BHY, Kim LJ, et al. Leptin Induces Hypertension Acting on Transient Receptor Potential Melastatin 7 Channel in the Carotid Body. *Circ Res.* 2019;125(11):989–1002.
29. Pan W, Allison MB, Sabatini P, Rupp A, Adams J, Patterson C, et al. Transcriptional and physiological roles for STAT proteins in leptin action. *Mol Metab [Internet].* 2019;22(January):121–31. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.01.007>
30. Dragano NRV, Haddad-Tovolli R, Velloso LA. Leptin, Neuroinflammation and Obesity. *Front Horm Res.* 2017;48:84–96.
31. Friedman JM. Leptin and the endocrine control of energy balance. *Nat Metab [Internet].* 2019;1(8):754–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s42255-019-0095-y>

32. Feldhammer M, Uetani N, Miranda-Saavedra D, Tremblay ML. Ptp1b: A simple enzyme for a complex world. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2013;48(5):430–45.
33. Baldini G, Phelan KD. The melanocortin pathway and control of appetite-progress and therapeutic implications. 2019;
34. Nikanorova AA, Barashkov NA, Pshennikova VG, Nakhodkin SS, Gotovtsev NN, Sazonov NN, et al. The Role of Nonshivering Thermogenesis Genes on Leptin Levels Regulation in Residents of the Coldest Region of Siberia.pdf. 2021.
35. Liu H, Du T, Li C, Yang G. STAT3 phosphorylation in central leptin resistance. Vol. 18, *Nutrition and Metabolism*. 2021.
36. Zhao S, Kusminski CM, Elmquist JK, Scherer PE. Leptin: Less is more. *Diabetes*. 2020;69(5):823–9.
37. Henrique P, Alves R, Junio A, Ferron T, Costa MR, Hasimoto FK, et al. Relationship between Innate Immune Response Toll-Like Receptor 4 ( TLR-4 ) and the Pathophysiological Process of Obesity Cardiomyopathy. 2021;4(1):91–9.
38. Lemmer IL, Willemsen N, Hilal N, Bartelt A. A guide to understanding endoplasmic reticulum stress in metabolic disorders. Vol. 47, *Molecular Metabolism*. 2021.
39. Mullins CA, Gannaban RB, Khan MS, Shah H, Siddik MAB, Hegde VK, et al. Neural underpinnings of obesity: The role of oxidative stress and inflammation in the brain. *Antioxidants*. 2020;9(10):1–21.
40. Zieba DA, Biernat W, Barć J. Roles of leptin and resistin in metabolism, reproduction, and leptin resistance. *Domest Anim Endocrinol*. 2020;73.
41. Ye Z, Liu G, Guo J, Su Z. Hypothalamic endoplasmic reticulum stress as a key mediator of obesity-induced leptin resistance. Vol. 19, *Obesity Reviews*. 2018. p. 770–85.
42. Gong T, Torres DJ, Berry MJ, Pitts MW. Free Radical Biology and Medicine Hypothalamic redox balance and leptin signaling - Emerging role of selenoproteins. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2018;127(February):172–81. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.02.038>

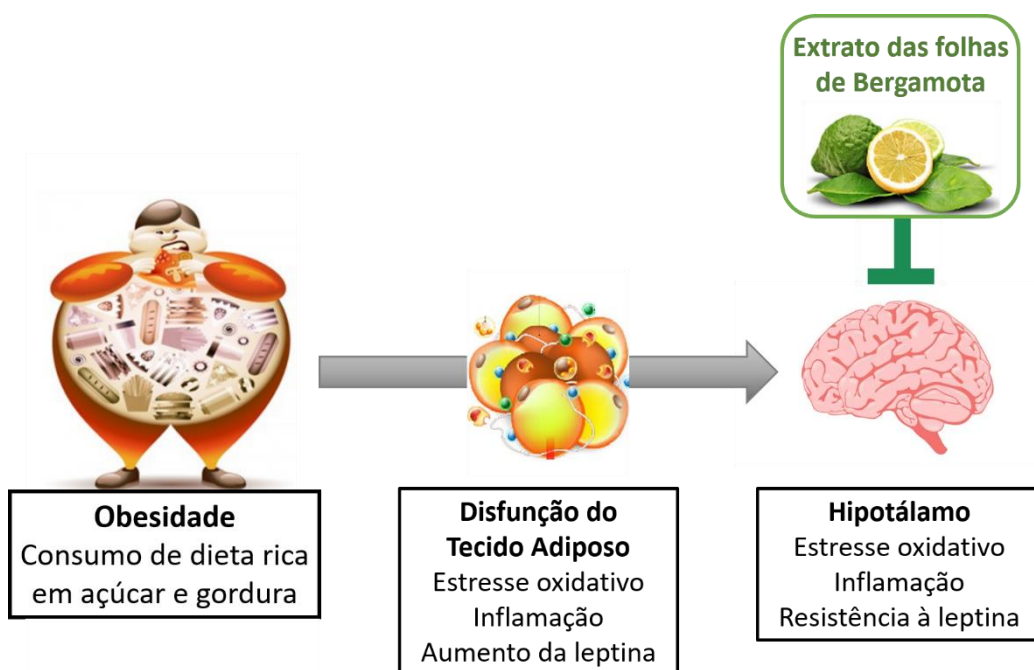
43. Sufyan M, Benchoula K, Serpell CJ, Eng W. AgRP / NPY and POMC neurons in the arcuate nucleus and their potential role in treatment of obesity. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 2022;915(October 2021):174611. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174611>
44. Aberdein N, Dambrino RJ, Carmo JM, Wang Z, Mitchell LE, Drummond HA, et al. Role of PTP1B in POMC neurons during chronic high-fat diet : sex differences in regulation of liver lipids and glucose tolerance. 2022;(11):478–88.
45. Kern L, Mittenbuhler MJ, Vesting AJ, Ostermann AL, Wunderlich CM, Wunderlich FT. Obesity-Induced TNF and IL-6 Signaling\_ The Missing Link between Obesity and Inflammation.pdf. 2019.
46. Uciechowski P, Dempke WCM. Interleukin-6: A Masterplayer in the Cytokine Network. *Oncol*. 2020;98(3):131–7.
47. Francisqueti FV, Minatel IO, Ferron AJT, Bazan SGZ, Silva V dos S, Garcia JL, et al. Effect of gamma-oryzanol as therapeutic agent to prevent cardiorenal metabolic syndrome in animals submitted to high sugar-fat diet. *Nutrients*. 2017;9(12).
48. Francisqueti FV, Ferron AJT, Hasimoto FK, Alves PHR, Garcia JL, dos Santos KC, et al. Gamma oryzanol treats obesity-induced kidney injuries by modulating the adiponectin receptor 2/PPAR- $\alpha$  axis. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018.
49. Ballistreri G, Amenta M, Fabroni S, Consoli V, Grosso S, Vanella L, et al. Evaluation of lipid and cholesterol-lowering effect of bioflavonoids from bergamot extract. 2021. p. 5378–83.
50. Ferlazzo N, Cirimi S, Calapai G, Ventura-Spagnolo E, Gangemi S, Navarra M. Anti-inflammatory activity of Citrus bergamia derivatives: Where do we stand? Vol. 21, *Molecules*. 2016.
51. Górnaiak I, Bartoszewski R, Króliczewski J. Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids.pdf. 2019. p. 241–72.
52. Maleki SJ, Crespo JF, Cabanillas B. Anti-inflammatory effects of flavonoids.pdf. 2019.
53. Musolino V, Gliozzi M, Nucera S, Carresi C, Maiuolo J, Mollace R, et al. The effect of bergamot polyphenolic fraction on lipid transfer protein system and vascular oxidative stress in a rat model of hyperlipemia.

2019. p. 1–8.

54. Baron G, Altomare A, Mol M, Garcia JL, Correa C, Raucci A, et al. Analytical profile and antioxidant and anti-inflammatory activities of the enriched polyphenol fractions isolated from bergamot fruit and leave. *Antioxidants*. 2021;10(2):1–27.
55. Interdipartimentale C. Protective Effects of Bergamot ( Citrus bergamia Risso & Poiteau ) Juice in Rats Fed with High-Fat Diet Authors. 2019;
56. Rondanelli M, Peroni G, Riva A, Petrangolini G, Allegrini P, Fazia T, et al. Bergamot phytosome improved visceral fat and plasma lipid profiles in overweight and obese class I subject with mild hypercholesterolemia: A randomized placebo controlled trial. *Phyther Res*. 2020;(October):1–12.
57. Musolino V, Gliozzi M, Scarano F, Bosco F, Scicchitano M, Nucera S, et al. Bergamot Polyphenols Improve Dyslipidemia and Pathophysiological Features in a Mouse Model of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Sci Rep*. 2020;10(1):1–14.
58. Carolo dos Santos K, Santiloni Cury S, Costa Rodrigues Ferraz AP, Corrente JE, Mariani Gonçalves B, De Araújo Machado LH, et al. Recovery of Cardiac Remodeling and Dysmetabolism by Pancreatic Islet Injury Improvement in Diabetic Rats after Yacon Leaf Extract Treatment. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018(4):1–9.
59. Formisano C, Rigano D, Lopatriello A, Sirignano C, Ramaschi G, Arnoldi L, et al. Detailed Phytochemical Characterization of Bergamot Polyphenolic Fraction (BPF) by UPLC-DAD-MS and LC-NMR. *J Agric Food Chem*. 2019;67(11):3159–67.

## Justificativa e Hipótese

A obesidade desencadeada pelo consumo de dietas ricas em açúcar e gordura está associada à inflamação e ao estresse oxidativo, condições que podem atingir diversos órgãos, dentre eles o cérebro, especificamente o hipotálamo, bloqueando a correta fosforilação do receptor de leptina, desencadeando assim um quadro de resistência à ação desse hormônio. Diante desse cenário, a hipótese do trabalho é que o extrato das folhas de bergamota, devido às propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, é capaz de atenuar a resistência à leptina por reduzir a inflamação e o estresse oxidativo hipotalâmicos (Figura 5).



**Figura 5:** A obesidade, induzida pelo alto consumo de dieta rica em açúcar e gordura, está associada à inflamação e ao estresse oxidativo, condições que podem prejudicar diversos órgãos. No tecido adiposo, promove alteração na secreção de adipocinas que, no hipotálamo, interfere na correta fosforilação do receptor de leptina, desencadeando um quadro de resistência à ação desse hormônio. Diante disso, a hipótese do trabalho é que o extrato da folha de bergamota, devido às propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, é capaz de atenuar a inflamação e o estresse oxidativo hipotalâmicos, melhorando a sensibilidade à leptina.

## **Objetivo**

O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito terapêutico do extrato das folhas de bergamota sobre a resistência à leptina em modelo experimental de obesidade induzida por dieta rica em açúcar e gordura.

### *Objetivos Específicos*

Avaliar o efeito terapêutico do extrato das folhas de bergamota sobre os parâmetros metabólicos da obesidade.

Avaliar o efeito terapêutico do extrato das folhas de bergamota sobre o estado RedOx e inflamatório no tecido adiposo e hipotalâmico.

Avaliar o efeito terapêutico do extrato das folhas de bergamota sobre a via de sinalização da leptina no hipotálamo.

## ***Capítulo 2 - Artigo científico***

---

## **Efeito terapêutico do extrato das folhas de Bergamota (*Citrus bergamia*) sobre a resistência à leptina em modelo experimental de obesidade induzida por dieta rica em açúcar e gordura**

Erika Tiemi Nakandakare-Maia<sup>1</sup>; Juliana Silva Siqueira<sup>1</sup>; Artur Junio Togneri Ferron<sup>1</sup>; Thiago Luiz Novaga Palácio<sup>1</sup>; Jéssica Leite Garcia<sup>1</sup>; Giovanna Baron<sup>2</sup>; Giancarlo Aldini<sup>2</sup>; Fabiane Valentini Francisqueti-Ferron<sup>1</sup>; Camila Renata Corrêa<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Faculdade de Medicina, UNESP, Botucatu.

<sup>2</sup> Universidade de Milão, Itália.

### **Resumo**

A inflamação e o estresse oxidativo consequentes à obesidade são associados a diversas complicações, como resistência à leptina. A bergamota (*Citrus bergamia*) é um composto bioativo com ação antioxidante e anti-inflamatória com benefícios no tratamento de algumas doenças metabólicas. **Objetivo:** avaliar o efeito terapêutico do extrato de folhas de bergamota (B) sobre a resistência à leptina em modelo experimental de obesidade induzida por dieta rica em açúcar e gordura. **Metodologia:** ratos Wistar machos (n=28) foram distribuídos em 2 grupos: dieta controle (C, n=14 animais) e dieta rica em açúcar e gordura (HSF, n=14 animais) por 20 semanas. Após detectada hiperleptinemia, os grupos foram redistribuídos em: controle e tratamento placebo (C, n=7); controle + e tratamento com B (C+B, n=7); HSF e tratamento placebo (HSF, n=7); HSF e tratamento com B (HSF+ B, n=7) por 10 semanas. A concentração do extrato foi 50mg/kg de peso, diluído em água e administrado diariamente por gavagem; o placebo foi água. Foram avaliados: parâmetros nutricionais, parâmetros inflamatórios e de estresse oxidativo no tecido adiposo (TA) e hipotálamo, comorbidades associadas à obesidade. **Resultados:** os animais HSF apresentaram obesidade, síndrome metabólica, resistência à insulina, além de inflamação e estresse oxidativo no TA e hipotálamo; os animais HSF+B, apresentaram melhora da inflamação e do estresse oxidativo no hipotálamo e no TA, diminuição da glicemia, triglicérides e HOMA-IR, e dos níveis de leptina plasmática. **Conclusão:** conclui-se que o extrato das folhas de bergamota apresentou efeito terapêutico sobre a resistência à leptina associada à obesidade.

**Palavras chave:** obesidade; resistência leptina; bergamota

## Introdução

O consumo de dietas ricas em açúcar e gordura induz à obesidade, a qual é referida como um grande problema mundial de saúde, sendo um fator de risco para outras doenças, como diabetes tipo II, doenças cardiovasculares, distúrbios imunológicos e, inclusive, alguns tipos de câncer (1). Em condições de balanço energético positivo, a expansão do tecido adiposo branco, principalmente pela hipertrofia, desequilibra a produção de hormônios, citocinas e espécies reativas de oxigênio, resultando em disfunção do tecido adiposo, caracterizado por estresse oxidativo e inflamação (2). Dentre as adipocinas, cuja secreção é alterada por esse cenário fisiopatológico, está a leptina, a qual exerce importante função principalmente no consumo alimentar (3).

As concentrações plasmáticas de leptina são proporcionais ao volume de adipócitos, e embora estejam geralmente aumentadas em indivíduos obesos, sua ação fisiológica é prejudicada devido à disfunção do tecido adiposo (4). Como esse mecanismo ainda não foi totalmente elucidado, há alguns fatores que podem estar envolvidos nesse processo, como a dessensibilização do receptor de leptina por exposição crônica a elevadas concentrações desse hormônio ou, ainda, uma falha em sua sinalização relacionada à superexpressão de reguladores negativos, induzindo à exposição crônica de hiperleptinemia que caracteriza o quadro de resistência à leptina (5).

Na tentativa de controlar os danos causados por essa extensão patológica da obesidade, tem-se pesquisado sobre compostos bioativos com ação antioxidante e anti-inflamatória. A bergamota é um citrus, já muito utilizado para a indústria cosmética e alimentícia, tem despertado o interesse de pesquisadores por sua composição rica em flavonoides com potencial atividade antioxidante e anti-inflamatória (6). Assim, nos últimos anos, vários estudos têm comprovado os efeitos hipoglicemiantes e

hipolipidêmico da bergamota, mostrando sua eficácia no tratamento de algumas doenças metabólicas (7,8). Diante disso, a hipótese desse trabalho é que o extrato das folhas de bergamota, devido às propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, é capaz de atenuar a resistência à leptina por reduzir a inflamação e o estresse oxidativo hipotalâmicos. E o objetivo foi avaliar o efeito terapêutico do extrato das folhas de bergamota sobre a resistência à leptina em modelo experimental de obesidade induzida por dieta rica em açúcar e gordura.

## **Materiais e métodos**

### **Animais e protocolo experimental**

Nesse estudo, foram utilizados ratos Wistar machos (n=28), com 30 dias de idade, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP, São Paulo, Brasil. Os animais foram aleatoriamente distribuídos em 2 grupos para receberem dieta controle (C, n=14 animais), e a dieta rica em açúcar e gordura, *High Sugar Fat*, (HSF, n=14) por um período de 20 semanas. Na dieta HSF, também inclui sacarose na água de beber na concentração de 25%. O modelo dietético segue o padrão já estabelecido e publicado por nosso grupo de pesquisa (9). Após detectada diferença estatística dos níveis plasmáticos de leptina e o índice que avalia a resistência insulínica, os animais foram redistribuídos em 4 grupos. No grupo controle, 7 desses animais receberam a dieta controle com tratamento placebo (C+ P, n=7) e outros 7 animais foram destinados à dieta controle com extrato da folha de bergamota (C+ B, n=7). A mesma redistribuição ocorreu no grupo HSF, mantendo a dieta rica em açúcar e gordura e a água com sacarose 25%, sendo que 7 animais receberam o tratamento placebo (HSF+P, n=7) e, para os outros 7 animais,

o extrato da folha de bergamota (HSF+B, n=7), pelo período de 10 semanas de tratamento, totalizando 30 semanas de experimento.

As ofertas de ração e água foram *ad libitum*. O consumo das dietas e da ingestão calórica sob controle diário; a ingestão calórica foi determinada pelo produto do consumo e teor energético das dietas. Para acompanhar o desenvolvimento do animal, o peso corporal foi aferido semanalmente. Os ratos foram mantidos em gaiolas individuais, em ambiente com temperatura ( $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e umidade controladas ( $55\pm 5\%$ ), ciclo claro-escuro (12-12hs) e meio enriquecido com toalhas de papel amassadas em formato de bolas. O protocolo de estudo foi submetido para aprovação pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP, São Paulo, Brasil (CEUA: 1393/2021), e cumpriu as recomendações do *Guide for the Care and Use of Experimental Animals*. Concluídas as 30 semanas de experimento, os animais permaneceram em jejum de 8 horas, para assim serem anestesiados com tiopental (120mg/Kg/IP). Após verificar ausência dos reflexos palpebral, podal, interdigital e caudal, os animais foram eutanasiados por decapitação para a coleta dos tecidos e sangue necessários para as avaliações. O sangue foi coletado em tubos *Falcon*, contendo o anticoagulante, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) na proporção de 0,1 mL para cada 5 mL de sangue e em seguida centrifugadas (3000rpm; 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  em Eppendorf® Centrifuge 5804-R, Hamburg, Germany).

## **Dieta**

Nesse modelo dietético padronizado pelo nosso grupo de pesquisa, temos dois tipos de dietas: controle e HSF. A dieta controle foi constituída de farelo de soja, sorgo, casca de soja, dextrina, óleo de soja, vitaminas e minerais. Já a dieta HSF continha farelo de soja, sorgo, casca de soja, dextrina, vitaminas e minerais em quantias distintas, acrescida de frutose,

banha suína e 25% de sacarose na água potável. A composição das rações se encontra na tabela 1.

**Tabela 1.** Composição das rações

| <b>Ingredientes</b>       | <b>Dietas</b>   |            |
|---------------------------|-----------------|------------|
|                           | <b>Controle</b> | <b>HSF</b> |
| Farelo de soja (g/kg)     | 335             | 340        |
| Sorgo (g/kg)              | 278             | 80         |
| Casca de soja (g/kg)      | 188.5           | 116.7      |
| Dextrina (g/kg)           | 146.5           | 20         |
| Sacarose (g/kg)           | -               | 80         |
| Frutose (g/kg)            | -               | 180        |
| Óleo de soja (g/kg)       | 14              | -          |
| Banha (g/kg)              | -               | 154.3      |
| Minerais (g/kg)           | 25              | 25         |
| Sal (g/kg)                | 4               | 8          |
| <b>Componentes</b>        |                 |            |
| Proteína (%)              | 20              | 16         |
| Carboidrato (%)           | 60              | 70         |
| Gordura (%)               | 4               | 14.6       |
| % Energia de proteínas    | 22.85           | 13.45      |
| % Energia de carboidratos | 66.78           | 58.69      |
| % Energia de gordura      | 10.37           | 27.8       |
| Energia (kcal/g)          | 3,59            | 4,35       |

HSF: adição também de 25% de sacarose na água

### **Extrato da folha de bergamota e administração**

O extrato das folhas de bergamota foi providenciado pela Universidade de Milão através da parceria com o professor Dr. Giancarlo Aldini. Para a extração dos polifenóis, as folhas de bergamota foram colhidas, picadas e adicionadas a uma solução de água/etanol. Em seguida, o etanol foi destilado e a solução de água clarificada foi passada por uma camada de resinas absorventes de poliestireno com poros,

diâmetro compreendido entre 100 e 150 Angstrom. Os polifenóis retidos foram extraídos por eluição do leito de resinas com etanol puro. A solução etanólica obtida foi destilada a temperatura de até 40°C, obtendo-se um concentrado de água residual e polifenóis, que foi seco por pulverização, assim resultando em um pó com menos de 40% de umidade.

A administração desse extrato, diluído em água potável, foi realizada diariamente por gavagem com concentração de 50 mg/Kg de peso. Como não há trabalhos com o extrato da folha de bergamota, a dose foi estabelecida de acordo com os dados da literatura, que utilizam essa concentração em estudos com o suco da fruta (10). Os animais do grupo placebo receberam apenas água potável por gavagem, na mesma frequência do grupo tratado.

### **Parâmetros nutricionais**

O peso corporal foi verificado e registrado semanalmente, assim permitindo o acompanhamento do ganho de peso durante todo o período experimental. Os parâmetros nutricionais avaliados foram a ingestão de ração, a ingestão hídrica e a ingestão calórica. A ingestão calórica foi determinada multiplicando o valor energético de cada dieta (g x Kcal) pelo consumo diário de alimentos mais as calorias da água ( $0,25 \times 4 \times \text{mL}$  consumidas).

### **Caracterização da obesidade**

#### **Índice de adiposidade**

O índice de adiposidade (IA) foi utilizado como indicador de obesidade, já que permite avaliar precisamente a quantidade de gordura corporal dos animais. Após a eutanásia, foram dissecados os depósitos de

gordura epididimal (TAE), visceral (TAV) e retroperitoneal (TAR) dos animais. O índice de adiposidade foi calculado a partir da soma dos depósitos normalizada pelo peso corporal, através da seguinte fórmula (11):

$$IA = [(TAE + TAR + TAV) / \text{peso corporal final}] \times 100.$$

### **Pressão Arterial sistólica**

A análise da pressão arterial sistólica caudal foi realizada por meio da técnica de plestimografia, utilizando-se eletroesfigmomanômetro Narco Bio-System® PE 300, modelo 709-0610 (*International Biomedical, Inc*, Houston, TX, USA). Este método não permite avaliar a pressão arterial diastólica. Os animais foram aquecidos (38°C), durante 5 minutos, em uma caixa de madeira (50x40 cm) forrada com maravalha de *Pinus* autoclavada, com a finalidade de causar vasodilatação da artéria caudal (12). Em seguida, o manguito conectado a transdutor de pulso foi acoplado à cauda do animal, sendo posteriormente insuflado (200 mmHg) e desinsuflado, respectivamente, para registro das pulsações arteriais. Os registros foram coletados em polígrafo Gould RS 3200 (*Gould Instrumenta Valley View*, Ohio, USA).

### **Perfil glicêmico e níveis lipídicos plasmáticos**

A concentração de glicose foi determinada pela punção da veia caudal com o auxílio do glicosímetro (Accu-Check Performa, Roche Diagnostics). Para a determinação de triglicérides, utilizou-se o plasma e o kit específico (kit CELM®, Barueri, São Paulo, Brasil). O método utilizado foi o enzimático-colorimétrico e a análise foi realizada em aparelho automatizado (Technicon, RA-XTTM System, *Global Medical Instrumentation*, Minnessota, USA).

## **Níveis plasmáticos de leptina, insulina e resistência insulínica**

A quantificação de leptina foi obtida no plasma por meio da técnica de ELISA, utilizando kit comercial (*Linco Research Inc., R&D Systems, Millipore e B-Brigde International Inc.*). A leitura foi realizada em espectrofotômetro de microplaca Spectra Max 190 (Molecular Devices®, Sunnyvale, CA, USA).

A quantificação de insulina também foi obtida no plasma por meio da técnica de ELISA, utilizando kit comercial (*Linco Research Inc., R&D Systems, Millipore e B-Brigde International Inc.*). A leitura foi realizada em espectrofotômetro de microplaca Spectra Max 190 (Molecular Devices®, Sunnyvale, CA, USA).

O modelo de avaliação da homeostase da resistência à insulina (*homeostatic model assessment of insulin resistance - HOMA-IR*), considerado marcador de resistência à insulina, foi calculado de acordo com a fórmula:

$$\text{HOMA-IR} = (\text{glicemia de jejum (mmol/L)} \times \text{insulina de jejum (\mu U/mL)})/22.5.$$

## **Indicadores de estresse oxidativo e concentração de adipocinas pró-inflamatórias no tecido adiposo e hipotálamo**

A disfunção do tecido adiposo é a causa principal da obesidade desencadeando em aumento de secreção de adipocinas (13). Uma vez que essas moléculas desencadeiam complicações e comorbidades, avaliamos as concentrações de citocinas pró-inflamatórias e indicadores de estresse oxidativo no TAE e hipotálamo.

### *Preparação do tecido para Análises*

Aproximadamente, 400mg de TAE foram homogeneizados em solução fria de *Phosphate-buffered saline* (PBS, 2mL, pH 7.4) usando o ULTRA-TURRAX® T25 basic IKA® Werke Staufen/Germany, e centrifugados a 800rpm a 4°C por 10 minutos. A camada logo abaixo da gordura foi coletada e, em seguida, as análises foram realizadas. Esse material também foi utilizado para analisar a concentração de proteínas totais pelo método de biureto através de kits comerciais (kits CELM®, Barueri, São Paulo, Brasil), para correção das análises de adipocinas e indicadores de estresse oxidativo.

Já para as análises hipotalâmicas, aproximadamente 50mg de hipotálamo foram homogeneizados em solução fria de PBS (500uL, pH 7.4) usando o ULTRA-TURRAX® T25 basic IKA® Werke Staufen/Germany, e centrifugadas a 800rpm a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e, em seguida, as análises foram realizadas.

### **Indicadores de estresse oxidativo**

A carbonilação de proteínas foi quantificada pelo método adaptado de Mesquita et al. (14). Em 100 µL de sobrenadante do tecido hipotalâmico foi adicionado 100 µL 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) (10 mM em HCl 2 M) em placas contendo 96 weels. Em seguida, foram incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente e, posteriormente, foi adicionado 50 µL de NaOH (6 M) e incubadas novamente nas mesmas condições. A leitura foi realizada a 450 nm em leitor de microplaca Spectra Max 190 (Molecular Devices®, Sunnyvale, CA, USA) e o resultado foi obtido da absorbância das amostras e do coeficiente de extinção molar ( $22000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), sendo o resultado final expresso em nmol/mg de proteínas.

O Malondialdeído (MDA) é um indicador de peroxidação lipídica. Para a quantificação, foram utilizados 100 µL de sobrenadante de homogenato de tecido hipotalâmico (realizado por turrax na concentração 1:10 em solução de PBS) para 750 µL de ácido tricloroacético 10%. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos (Eppendorf® Centrifuge 5804-R, Hamburg, Germany). Foi adicionado ao sobrenadante ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67% na proporção (1:1) e, em seguida, as amostras foram aquecidas durante 45 minutos em banho Maria a 100°C. O MDA reagiu com o TBA na proporção 1:2 MDA-TBA e, após resfriamento, foi realizada a leitura a 535 nm em leitor de microplaca Spectra Max 190 (Molecular Devices®, Sunnyvale, CA, USA). A concentração de MDA foi obtida através do coeficiente de extinção molar ( $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) e das absorbâncias das amostras, o resultado final foi expresso em nmol/g de proteína.

### **Adipocinas pró-inflamatórias**

As concentrações de TNF- $\alpha$  e IL-6 foram quantificadas através da técnica de ELISA, utilizando kits comerciais específicos (*Linco Research Inc., R&D Systems, Millipore e B-Brigde International Inc.*). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro de microplaca Spectra Max 190 (Molecular Devices®, Sunnyvale, CA, USA).

### **Expressões proteicas hipotalâmicas de JAK-2, STAT-3 e SOCS-3**

Para essas análises, os fragmentos de hipotálamo (50mg) foram homogeneizados em tampão de lise e submetidos à centrifugação. O sobrenadante foi coletado e a concentração proteica analisada pelo método *Bradford*<sup>24</sup>. Após a quantificação, as amostras foram diluídas em solução tampão, contendo Tris-HCl 50 mM (pH 6.8), 2-Mercaptoetanol 200 mM,

SDS 2%, azul de bromofenol 0.1% e glicerol 10%. As diluições foram aquecidas e submetidas ao processo de eletroforese para separação das proteínas, utilizando o sistema Mini- Protean 3 Electrophoresis Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Em seguida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em sistema Mini-Trans Blot (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), utilizando-se tampão de transferência. Os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana foram bloqueados mediante incubação com solução a 0,5% de leite em pó desnatado, dissolvido em tampão TBS-T pH 7,4. Logo após, a membrana foi lavada três vezes em solução basal e incubada com os anticorpos primários específicos para receptor de leptina, Jak-2 total e fosforilado, Stat-3 total e fosforilado, SOCS-3 e, posteriormente, com anticorpos secundários. Por fim, a imunodeteção foi realizada pelo método de quimioluminescência, conforme as instruções do fabricante (ECL SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate -Thermo Scientific, Rockford, IL, USA, 34080), e analisada por meio de um densitômetro (GS-710 calibrated imaging densit-ometer, Bio-Rad lab, CA, USA).

### **Análise Estatística**

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade e apresentados em média  $\pm$  desvio padrão, no caso das variáveis paramétricas, ou mediana (intervalo interquartil (25 – 75)), para as variáveis não paramétricas. Para avaliar as diferenças entre os grupos, foi realizada a análise de variância (ANOVA) de duas vias, considerando estatisticamente significativo o valor de  $p < 0,05$ . Assim, para permitir a comparação entre todos os grupos, as variáveis estatisticamente significativas foram submetidas ao teste pós-hoc de Tukey. Essas análises estatísticas foram sucedidas através do programa Sigma Stat para Windows versão 3.5 (Systat Software, Inc., San Jose, CA, USA).

## Resultados

### Panorama nutricional e comorbidades em 20 semanas

As análises nutricionais, metabólicas e hormonais expressas na tabela 2 se referem ao período de 20 semanas de dieta. O grupo HSF apresentou peso mais elevado se comparado com o grupo controle. Os parâmetros metabólicos como pressão arterial sistólica, glicose e triglicérides também se mantiveram superiores no grupo HSF em comparação com o grupo controle, assim como os níveis hormonais de insulina, leptina plasmática e o índice de resistência insulínica (HOMA IR).

**Tabela 2.** Análises nutricionais, metabólicas e hormonais na 20ª semana

| <b>Parâmetros nutricionais</b>    | <b>Grupo Controle</b> | <b>Grupo HSF</b>    | <b>Valor de <i>p</i></b> |
|-----------------------------------|-----------------------|---------------------|--------------------------|
| Consumo ração (g/dia)             | 23,2 ± 2              | 12,7 ± 2            | <b>0,001</b>             |
| Consumo hídrico (ml/dia)          | 34,9 ± 3              | 44,7 ± 5            | <b>0,001</b>             |
| Consumo calórico (Kcal/dia)       | 84,5 ± 8              | 90,8 ± 9            | 0,063                    |
| Peso (g)                          | 462 ± 55              | 511 ± 64            | <b>0,041</b>             |
| <b>Comorbidades</b>               | <b>Grupo Controle</b> | <b>Grupo HSF</b>    | <b>Valor de <i>p</i></b> |
| Pressão arterial sistólica (mmHg) | 116 ± 5               | 135 ± 7             | <b>0,001</b>             |
| Glicose (mg/dl)                   | 85,5 ± 7              | 96 ± 10             | <b>0,003</b>             |
| Insulina (ng/ml)                  | 0,49 (0,45 - 0,64)    | 1,06 (0,69 - 1,43)  | <b>0,004</b>             |
| HOMA-IR                           | 4,43 (3,95 - 5,29)    | 9,49 (6,73 - 14,28) | <b>0,002</b>             |
| Triglicérides (mg/dl)             | 97,5 (40,5 - 10,8)    | 187 (89 - 24)       | <b>0,002</b>             |
| Leptina plasmática (ng/ml)        | 2,24 (1,78 - 2,44)    | 3,37 (4,10)         | <b>0,038</b>             |

Dados expressos por média ± desvio padrão, mediana (intervalos interquartis). Comparação por Teste t de *Student*, considerando estatisticamente significativo o valor de  $p < 0,05$ . HSF – *high sugar fat diet*.

## Panorama nutricional e comorbidades em 30 semanas

A tabela 3 retrata os parâmetros nutricionais avaliados. Nestes, o grupo HSF mostrou superioridade no peso final, nos consumos hídrico e calórico em comparação com o grupo Controle. Já o grupo tratado com o extrato apresentou menor consumo hídrico e calórico quando comparado ao HSF, indicando a efetividade do tratamento com o *Citrus bergamia*, sendo capaz de reduzir significativamente tais índices avaliativos no grupo HSF tratado com bergamota.

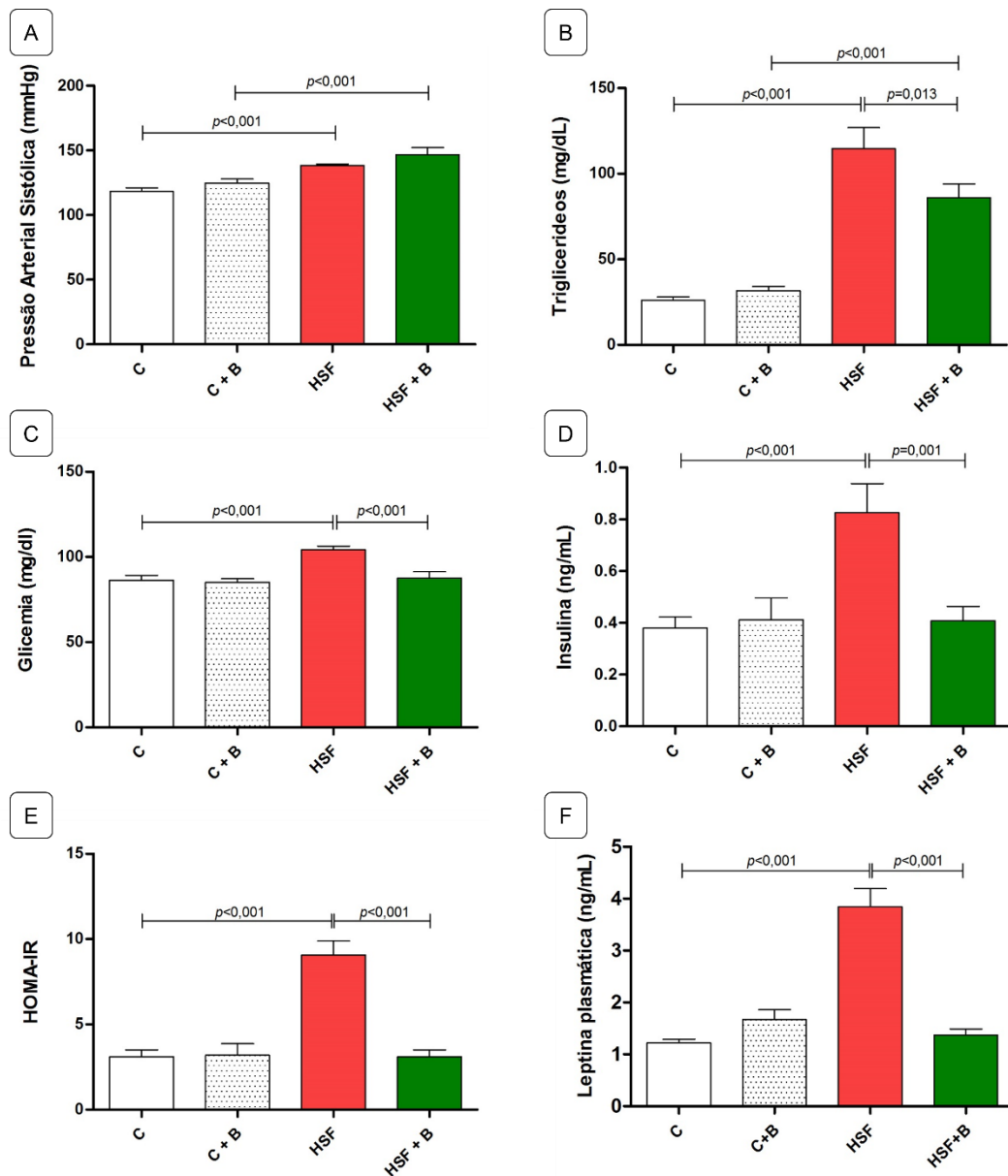
**Tabela 3.** Análises nutricionais na 30<sup>a</sup> semana

| Variáveis                   | Grupos       |              |                           |                            |
|-----------------------------|--------------|--------------|---------------------------|----------------------------|
|                             | C            | C + B        | HSF                       | HSF + B                    |
| Peso final (g)              | 482,2 ± 43,4 | 482,9 ± 83,0 | 579,9 ± 79,0 <sup>#</sup> | 573,9 ± 98,3 <sup>\$</sup> |
| Consumo alimentar (g/dia)   | 22,6 ± 1,7   | 22,5 ± 2,7   | 13,2 ± 1,1 <sup>#</sup>   | 11,6 ± 0,9 <sup>\$</sup>   |
| Consumo hídrico (ml/dia)    | 33,4 ± 1,9   | 35,6 ± 3,6   | 51,4 ± 3,7 <sup>#</sup>   | 45,9 ± 2,1 <sup>*\$</sup>  |
| Consumo calórico (Kcal/dia) | 82,4 ± 6,0   | 81,9 ± 9,9   | 98,6 ± 5,5 <sup>#</sup>   | 88,7 ± 4,4 <sup>*\$</sup>  |

Dados apresentados em média ± desvio padrão ( $n=7$  animais/grupo). Comparação por ANOVA de duas vias com post hoc de Tukey ( $p<0,05$ ): <sup>#</sup>C vs HSF; <sup>\*</sup>HSF vs HSF+B; <sup>\$</sup>C+B vs HSF+B. C- controle; HSF- dieta rica em açúcar e gordura; B- bergamota.

Na figura 6, observam-se os indicadores de comorbidades, os quais apresentam índices aumentados de triglicérides, glicemia, insulina e resistência insulínica, determinado pelo índice HOMA, no grupo HSF em relação ao controle. Já os mesmos níveis se encontram reduzidos no grupo HSF tratado quando comparado ao HSF. Nota-se, inclusive, o elevado índice de leptina plasmática no grupo HSF contraposto ao grupo controle. Contudo, verifica-se um baixo índice de leptina no grupo HSF tratado se comparado com o grupo HSF, indicando que o extrato da folha de bergamota teve o efeito terapêutico eficaz, já que a leptina plasmática aumentada remete ao quadro de resistência à leptina na obesidade,

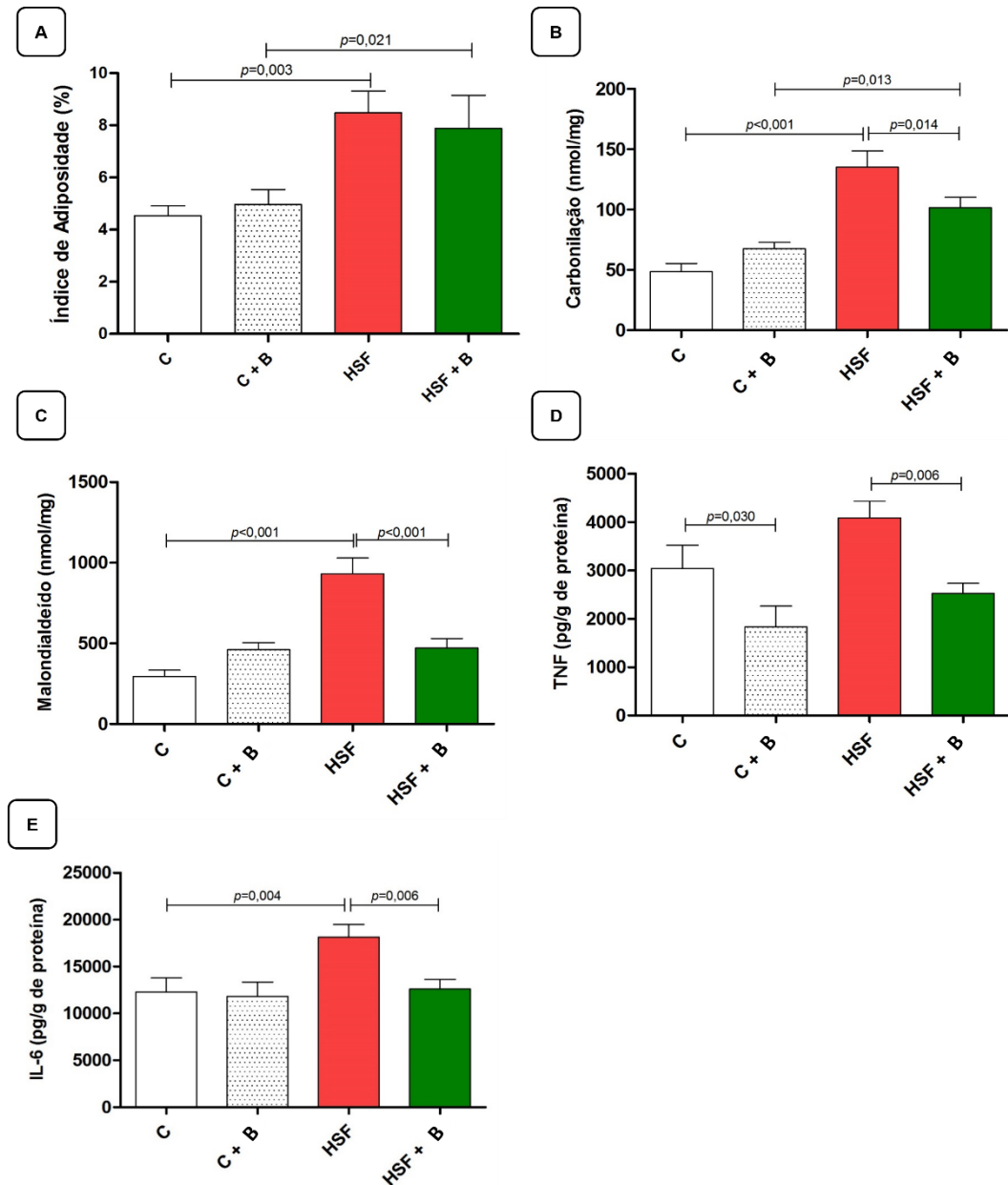
enquanto que menores níveis desse hormônio no plasma sugerem melhor interação com seus receptores alvos no hipotálamo.



**Figura 6.** Indicadores de comorbidades. A- Pressão arterial sistólica (mmHg); B- triglicerídeos (mg/dL); C- glicemia (mg/dL); D- insulina (ng/mL); E- HOMA-IR; F- leptina plasmática (ng/mL). Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Comparação por ANOVA de duas vias com post-hoc Tukey ( $p < 0,05$ ). C- Controle. B- Bergamota. HSF- *high sugar fat*. n=7 animais/grupo.

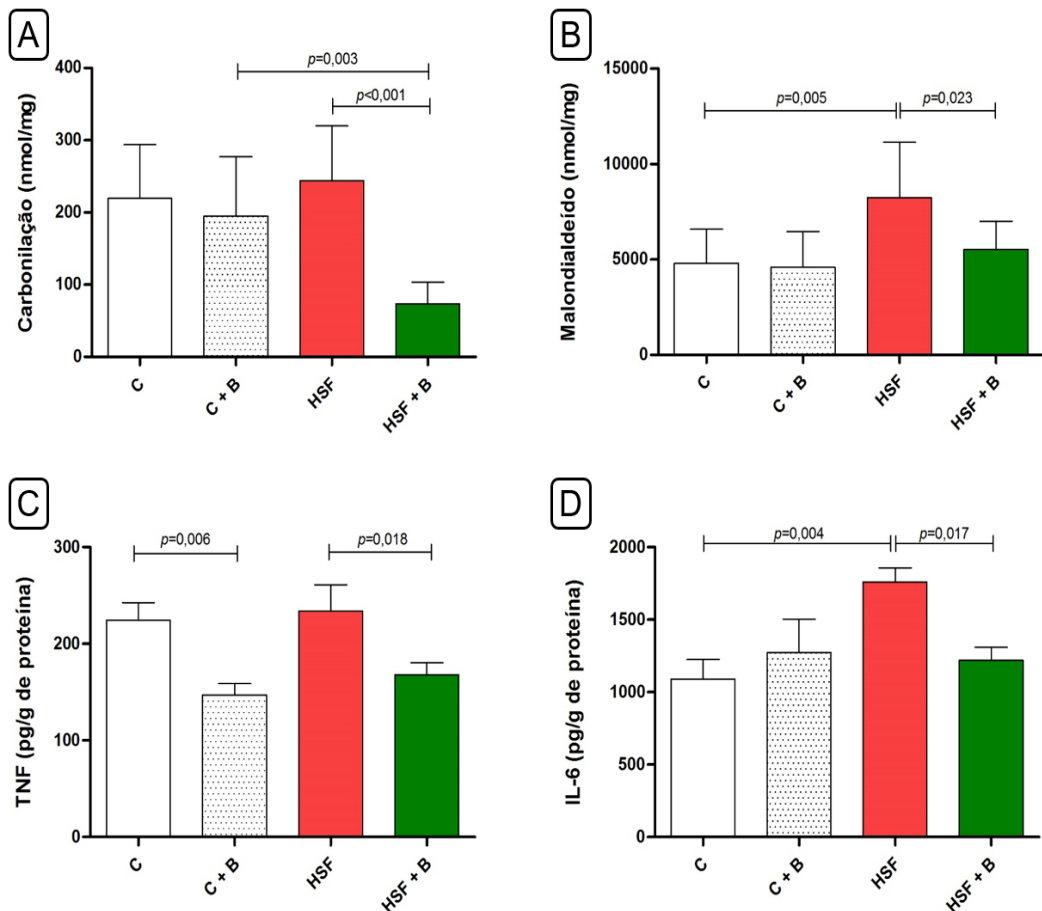
A figura 7 denota sobre a obesidade, caracterizada pelo índice de adiposidade, e os parâmetros oxidativos e inflamatórios do TAE, os quais

demonstraram que o grupo HSF apresentou maiores níveis de marcadores oxidativos e inflamatórios se comparado ao grupo controle. E, em todas essas análises realizadas no tecido adiposo, o grupo HSF tratado indica diminuição nesses parâmetros em relação ao grupo HSF.



**Figura 7.** Obesidade e parâmetros oxidativos e inflamatórios no TAE. A– índice de adiposidade; B– carbonilação de proteínas (nmol/mg); C– malondialdeído (nmol/mL); D– fator de necrose tumoral (pg/g de proteína); E– interleucina-6 (pg/g de proteína). Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Comparação por ANOVA de duas vias com post-hoc Tukey ( $p < 0,05$ ). C– Controle. B– Bergamota. HSF – *high sugar fat*.  $n=7$  animais/grupo.

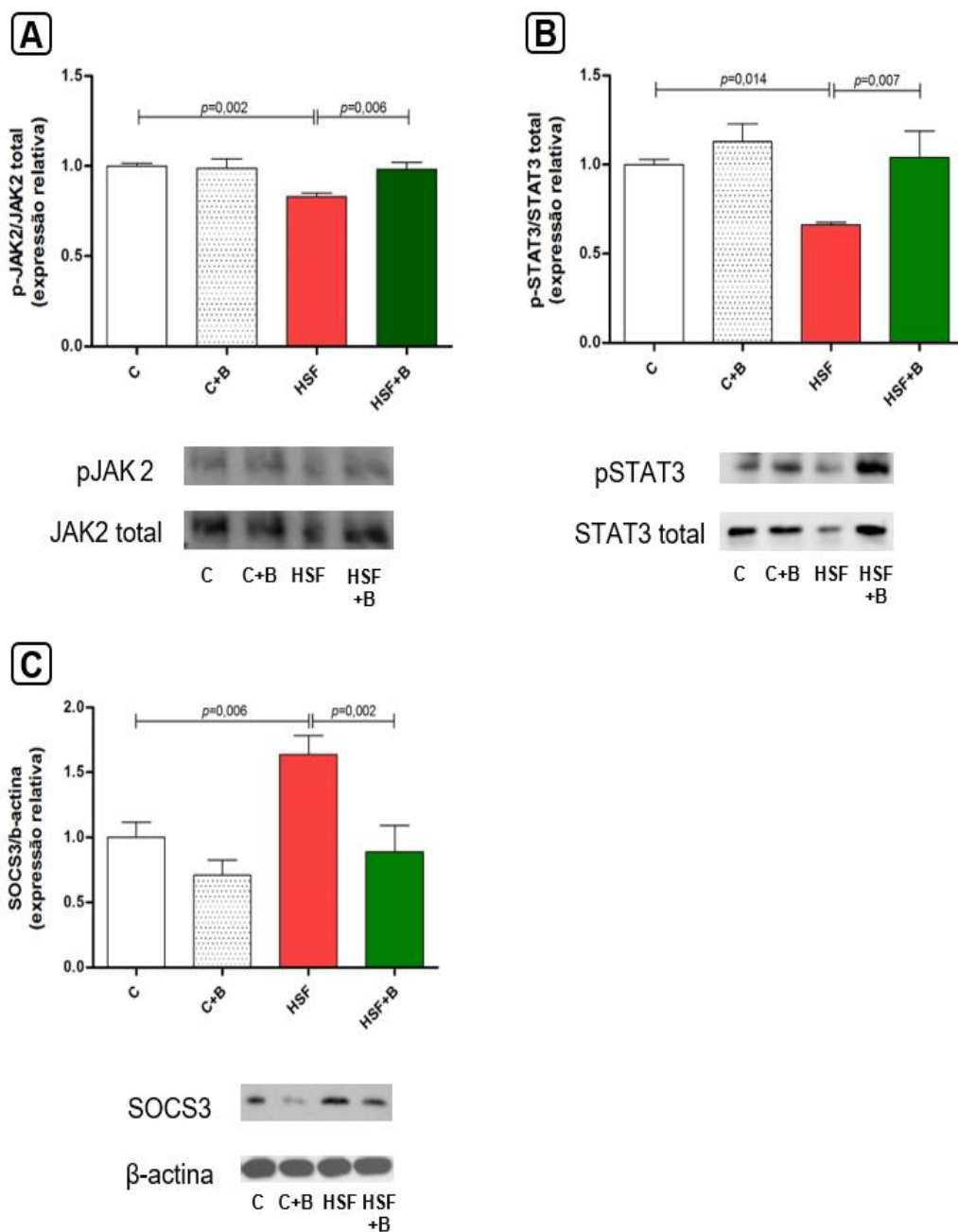
Os parâmetros oxidativos e inflamatórios hipotalâmicos são observados na figura 8. Nota-se que o grupo HSF teve maiores níveis de MDA e IL-6 em relação ao grupo controle. No entanto, o grupo HSF que recebeu o tratamento mostrou efeito positivo tanto no estresse oxidativo quanto no cenário inflamatório, dispondo de menores índices de carbonilação e MDA, assim como de TNF- $\alpha$  e IL-6 quando comparado ao grupo HSF.



**Figura 8.** Parâmetros oxidativos e inflamatórios hipotalâmicos. A– carbonilação (nmol/mg); B– malondialdeído (nmol/mg); C– fator de necrose tumoral (pg/g de proteína); D– interleucina-6 (pg/g de proteína). Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Comparação por ANOVA de duas vias com post-hoc Tukey ( $p < 0,05$ ). C– Controle. B– Bergamota. HSF– *high sugar fat*.  $n = 7$  animais/grupo.

Por fim, na figura 9, estão representados os resultados referentes às análises das expressões proteicas hipotalâmicas de JAK2, STAT3 e

SOCS3, as quais indicam a interação da leptina com seu receptor específico e sua ação fisiológica.



**Figura 9.** Via de sinalização da leptina. A- pJAK2/JAK2 total (expressão relativa); B- p-STAT3/STAT3 total (expressão relativa); C- SOCS3/b-actina (expressão relativa). Dados expressos em média ± desvio padrão. Comparação por ANOVA de duas vias com post-hoc de Tukey ( $p < 0,05$ ). C- Controle. B- Bergamota. HSF- *high sugar fat*. n=7 animais/grupo.

## Discussão

Esse estudo teve como objetivo avaliar o efeito terapêutico do extrato das folhas de bergamota sobre a resistência à leptina em modelo experimental de obesidade induzida por dieta rica em açúcar e gordura. Já é bem estabelecido na literatura que o consumo de dietas ricas em açúcar e gordura promove obesidade, considerada fator de risco para o desenvolvimento de diversas doenças, dentre elas, resistência à insulina, diabetes tipo 2, hipertensão arterial, dislipidemia e outras (9,15). Confirmando tais achados, nossos resultados demonstram que o grupo HSF desenvolveu obesidade, caracterizada pelo aumento no índice de adiposidade e síndrome metabólica, definida pela hipertensão, dislipidemia, e resistência insulínica. Em contrapartida, o grupo HSF tratado com bergamota apresentou melhora na sensibilidade à insulina e na dislipidemia. Tais achados podem ser explicados pelos polifenóis presentes na bergamota, especialmente as flavanonas naringina, neoeriocitrina e neohesperidina, encontradas geralmente em formas de agliconas ou glicosiladas em frutas cítricas, as quais desempenham efeitos hipolipemiantes, antioxidantes e anti-inflamatórios. Também são identificados os diglicosídeos neohesperidosídeo e rutinosídeo, por vezes, com uma fração HMG adicional, que se liga à glicose e melhora a captação dessa molécula (16,17).

Diversas hipóteses tentam explicar a origem das comorbidades associadas à obesidade, dentre elas, a disfunção do tecido adiposo. Em resposta a um balanço energético positivo, mecanismos dinâmicos reorganizam o tecido adiposo, alterando o número e o tamanho dos adipócitos maduros. Adipócitos hipertrofiados secretam fatores parácrinos (hormônios e citocinas), de maneira desregulada, levando à inflamação e estresse oxidativo (18,19). Nesse sentido, pode-se observar que os animais do grupo HSF apresentaram disfunção do tecido adiposo, uma vez que os

níveis de TNF- $\alpha$ , IL-6, carbonilação e MDA estavam elevados. Em oposição, os animais do grupo HSF + B apresentaram melhora da inflamação e do estresse oxidativo após o tratamento. Dentre os componentes da bergamota com importante atividade anti-inflamatória está a rutina, um flavonol glicosídico que também tem sido muito estudado devido ao seu efeito antibacteriano, antidepressivo e quimiopreventivo (17). Os polifenóis parecem inibir a inflamação por meio da supressão de mediadores pró-inflamatórios associados às vias do NF- $\kappa$ B, MAPK (Proteína-quinases ativadas por mitógenos) e AMPK (Proteína Quinase Ativada por Monofosfato de Adenosina) (20). Já o efeito antioxidante da bergamota pode ser explicado por quatro mecanismos distintos: 1- eliminam diretamente as espécies reativas de oxigênio (EROs) devido à presença de grupos hidroxila fenólicos em suas moléculas; 2- podem exercer atividade antioxidante através da regulação da produção e atividade de enzimas antioxidantes e oxidases endógenas; 3- podem aumentar a atividade antioxidante celular através da regulação da via mediada pelo Nrf2 (fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2); 4- podem neutralizar EROs via microRNAs reguladores (21).

A leptina regula a ingestão de alimentos, a massa corporal, o funcionamento reprodutivo e desempenha um papel vital no crescimento fetal, respostas imunes pró-inflamatórias, angiogênese e lipólise. No entanto, em condições de obesidade, ocorre o aumento dos níveis circulantes desse hormônio ao mesmo tempo que ocorre prejuízo das funções desempenhadas, caracterizando o quadro de resistência à leptina (22). A inflamação e o estresse oxidativo desencadeados pela obesidade são capazes de atingir o sistema nervoso central (SNC), inibindo o transporte de leptina no cérebro, resultando em resistência à ação desse hormônio. O aumento da expressão do supressor da sinalização da citocina-3 (SOCS3) é o principal indutor de resistência à leptina no SNC. SOCS3 inibe potentemente a via JAK/STAT, formando assim um ciclo de

*feedback* negativo (23). Nossos achados comprovaram que os animais do grupo HSF apresentaram resistência à leptina, caracterizada por aumento dos níveis de leptina circulantes, da inflamação e do estresse oxidativo no hipotálamo, maior consumo calórico, maior expressão da SOCS-3 e menor fosforilação da via JAK/STAT. Por outro lado, os animais HSF tratados com bergamota apresentaram atenuação da resistência à leptina, mesmo com índice de obesidade similar ao do grupo HSF, mostrando que os efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios da bergamota tiveram ação local hipotalâmica, melhorando a sinalização do hormônio no SNC.

## **Conclusão**

Em suma, esse estudo mostrou que a obesidade induzida por dieta desencadeou resistência à insulina, hipertensão, dislipidemia, disfunção do tecido adiposo e resistência à leptina. Em contrapartida, o tratamento com bergamota atenuou a resistência à insulina, dislipidemia e a resistência à leptina. Assim, pode-se concluir que o extrato das folhas de bergamota foi eficaz no tratamento da resistência à leptina em modelo experimental de obesidade induzida por dieta rica em açúcar e gordura.

## **Referências Bibliográficas**

1. Kawai T, Autieri M V., Scalia R. Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. *Am J Physiol - Cell Physiol.* 2021;320(3):C375–91.
2. Ghaben AL, Scherer PE. Adipogenesis and metabolic health | Enhanced Reader [Internet]. 2019. Available from: [moz-extension://3dca473d-faab-e94b-8490-a5e8eae653b2/enhanced-reader.html?openApp&pdf=https%3A%2F%2Fwww.nature.com%2Farticle/s%2Fs41580-018-0093-z.pdf](https://www.nature.com/articles/s41580-018-0093-z.pdf)
3. Mechanick JL, Zhao S, Garvey WT. Leptin, An Adipokine With

Central Importance in the Global Obesity Problem. 2018. p. 113–27.

4. Zhao S, Kusminski CM, Elmquist JK, Scherer PE. Leptin: Less is more. *Diabetes*. 2020;69(5):823–9.

5. Engin A. Diet-Induced Obesity and the Mechanism of Leptin Resistance. *Med Biol* [Internet]. 2017;960. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-48382-5>

6. Ferlazzo N, Cirimi S, Calapai G, Ventura-Spagnolo E, Gangemi S, Navarra M. Anti-inflammatory activity of Citrus bergamia derivatives: Where do we stand? Vol. 21, *Molecules*. 2016.

7. Musolino V, Gliozzi M, Nucera S, Carresi C, Maiuolo J, Mollace R, et al. The effect of bergamot polyphenolic fraction on lipid transfer protein system and vascular oxidative stress in a rat model of hyperlipemia. 2019. p. 1–8.

8. Ballistreri G, Amenta M, Fabroni S, Consoli V, Grosso S, Vanella L, et al. Evaluation of lipid and cholesterol-lowering effect of bioflavonoids from bergamot extract. 2021. p. 5378–83.

9. Francisqueti FV, Minatel IO, Ferron AJT, Bazan SGZ, Silva V dos S, Garcia JL, et al. Effect of gamma-oryzanol as therapeutic agent to prevent cardiorenal metabolic syndrome in animals submitted to high sugar-fat diet. *Nutrients*. 2017;9(12).

10. Musolino V, Gliozzi M, Scarano F, Bosco F, Scicchitano M, Nucera S, et al. Bergamot Polyphenols Improve Dyslipidemia and Pathophysiological Features in a Mouse Model of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Sci Rep*. 2020;10(1):1–14.

11. Francisqueti FV, Ferron AJT, Hasimoto FK, Alves PHR, Garcia JL, dos Santos KC, et al. Gamma oryzanol treats obesity-induced kidney injuries by modulating the adiponectin receptor 2/PPAR- $\alpha$  axis. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018.

12. Santos PP Dos, Rafacho BPM, Gonçalves ADF, Jaldin RG, Nascimento TB Do, Silva MAB, et al. Vitamin D Induces increased systolic arterial pressure via vascular reactivity and mechanical properties. *PLoS One*. 2014;9(6):1–9.

13. Taylor EB. The complex role of adipokines in obesity, inflammation, and autoimmunity. *Clin Sci*. 2021;135(6):731–52.

14. Mesquita CS, Oliveira R, Bento F, Geraldo D, Rodrigues J V, Marcos JC. Simplified 2 , 4-dinitrophenylhydrazine spectrophotometric assay for quantification of carbonyls in oxidized proteins. *Anal Biochem* [Internet]. 2014;458:69–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2014.04.034>
15. Francisqueti FV, Chiaverini LCT, Santos KC dos, Minatel IO, Ronchi CB, Ferron AJT, et al. The role of oxidative stress on the pathophysiology of metabolic syndrome. *Rev Assoc Med Bras*. 2017;63(1):85–91.
16. Carresi C, Gliozzi M, Musolino V, Scicchitano M, Scarano F, Bosco F, et al. The Effect of Natural Antioxidants in the Development of Metabolic Syndrome: Focus on Bergamot Polyphenolic Fraction. Available from: [www.mdpi.com/journal/nutrients](http://www.mdpi.com/journal/nutrients)
17. Salerno R, Casale F, Calandruccio C, Procopio A. Characterization of flavonoids in Citrus bergamia (Bergamot) polyphenolic fraction by liquid chromatography–high resolution mass spectrometry (LC/HRMS). *PharmaNutrition* [Internet]. 2016;4:S1–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phanu.2015.10.001>
18. Longo M, Zatterale F, Naderi J, Parrillo L, Formisano P, Raciti GA, et al. Adipose tissue dysfunction as determinant of obesity-associated metabolic complications. Vol. 20, *International Journal of Molecular Sciences*. 2019.
19. Reyes-Farias M, Fos-Domenech J, Serra D, Herrero L, Sánchez-Infantes D. White adipose tissue dysfunction in obesity and aging. Vol. 192, *Biochemical Pharmacology*. 2021.
20. Siriwardhana N, Kalupahana NS, Cekanova M, LeMieux M, Greer B, Moustaid-Moussa N. Modulation of adipose tissue inflammation by bioactive food compounds. Vol. 24, *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2013. p. 613–23.
21. Luo J, Si H, Jia Z, Liu D. Dietary anti-aging polyphenols and potential mechanisms. Vol. 10, *Antioxidants*. 2021. p. 1–20.
22. Obradovic M, Sudar-Milovanovic E, Soskic S, Essack M, Arya S, Stewart AJ, et al. Leptin and Obesity Role and Clinical Implication. 2021.
23. Son M, Oh S, Choi J, Jang JT, Choi CH, Park KY, et al. Attenuation of inflammation and leptin resistance by pyrogallol-phloroglucinol-6,6-bieckol on in the brain of obese animal models. Vol. 11, *Nutrients*. 2019.